

Alma Mater Studiorum · Università di Bologna

---

Dottorato di ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale

Progetto Nr.2 -Patologia Sperimentale

CICLO XXI

MED/05

***RUOLO DI RB E p53 NEI  
RAPPORTI TRA CRESCITA E  
PROLIFERAZIONE IN CELLULE  
NEOPLASTICHE.***

Dr. Giulio Donati

*Coordinatore:*

**Chiar.mo Prof.  
Sandro Grilli**

*Relatore:*

**Chiar.mo Prof.  
Massimo Derenzini**

---

Dipartimento di Patologia Sperimentale

**Anni Accademici 2006 -2008**

*Bologna, Gennaio 2009*

# Indice

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1	I checkpoints del ciclo cellulare . . . . .	1
1.2	Regolazione della progressione nel ciclo cellulare . . . . .	2
1.3	La biogenesi ribosomale . . . . .	5
1.4	Interazione fra ciclo cellulare e biogenesi ribosomale . . . . .	7
1.5	Attivazione di p53 e biogenesi ribosomale . . . . .	9
<b>2</b>	<b>SCOPI DELLO STUDIO</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>13</b>
3.1	Linee cellulari, condizioni di crescita e trattamenti farmacologici . .	13
3.2	Trasfezione di RNAi . . . . .	14
3.3	Trasduzione virale e selezione di cellule stabilmente trasfettate . . .	14
3.4	Estrazione di RNA totale, sintesi del cDNA e real time PCR . . . .	15
3.5	Estrazione di proteine ed immunoblot . . . . .	16
3.6	Incorporazione di $^3\text{[H]}$ -Uridina e di $^3\text{[H]}$ -Leucina . . . . .	18
3.7	Estrazione di RNA nucleare e valutazione del rRNA maturo nucleare	19
3.8	Colorazione al cristal violetto e curve di crescita . . . . .	19
3.9	Microscopia elettronica . . . . .	20
3.10	Tecniche immunocitochimiche e citochimiche . . . . .	21
3.10.1	Immunofluorescenza e incorporazione di fluorouridina . . . .	21
3.10.2	Immunoistochimica e incorporazione di bromodesossiuridina	22
3.10.3	Colorazione AgNOR . . . . .	23
3.11	Co-immunoprecipitazione . . . . .	23
3.12	Analisi del ciclo cellulare mediante citometria a flusso . . . . .	24

<b>4</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>26</b>
4.1	Inibizione della sintesi del rRNA mediante silenziamento di PolI . . .	26
4.1.1	Blocco della proliferazione e attivazione della via p53/p21/- RB nelle cellule silenziate per PolI . . . . .	27
4.1.2	Meccanismi di accumulo di p53 nelle cellule silenziate per PolI	28
4.2	L'equilibrio tra la sintesi di rRNA e di RP controlla p53 . . . . .	30
4.2.1	Il disequilibrio tra rRNA e RP come meccanismo di attiva- zione di p53 nella risposta al 5FU . . . . .	31
4.2.2	“Riequilibrare” la sintesi di rRNA e RP previene l'accumulo di p53 . . . . .	32
4.2.3	La riduzione contemporanea di rRNA e RP dovuta a condi- zioni di crescita restrittive non stabilizza p53 . . . . .	33
4.3	Ruolo di RB e p53 nell'arresto del ciclo cellulare conseguente il silenziamento di PolI . . . . .	44
4.3.1	Importanza di p53 nel blocco del ciclo cellulare nelle cellule silenziate per PolI . . . . .	44
4.3.2	Importanza di RB nel blocco del ciclo cellulare nelle cellule silenziate per PolI . . . . .	44
4.3.3	Il silenziamento PolI determina una riduzione della sintesi di E2F-1 . . . . .	46
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>53</b>
5.1	Il silenziamento di PolI come mezzo per studiare la relazione tra sintesi di rRNA e la proliferazione cellulare . . . . .	53
5.2	L'inibizione della sintesi di rRNA stabilizza p53 a causa dell'aumen- tata disponibilità di proteine ribosomali libere . . . . .	54
5.3	Importanza di RB e p53 nell'arresto del ciclo cellulare in risposta all'inibizione della sintesi di rRNA . . . . .	55
5.4	Ruolo chiave di E2F-1 nell'arresto del ciclo cellulare RB-dipendente a seguito del silenziamento di PolI . . . . .	57
5.5	Conclusioni . . . . .	58
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>59</b>

# Elenco delle tabelle

3.1	Tabella dei primers per la real time PCR . . . . .	24
3.2	Tabella degli RNAi . . . . .	25

# Elenco delle figure

1.1	Variazioni delle cicline durante il ciclo cellulare . . . . .	3
1.2	Nucleolo e biogenesi ribosomale . . . . .	6
1.3	Struttura del <i>rDNA</i> . . . . .	7
1.4	Stress che attivano p53 . . . . .	10
4.1	Equilibrio tra rRNA e RP come meccanismo di controllo di p53 . .	31
4.2	Il silenziamento di PolI blocca la sintesi di rRNA . . . . .	35
4.3	Blocco della proliferazione a seguito del silenziamento di PolI . . .	36
4.4	Il silenziamento di PolI stabilizza p53 mediante l'interazione MDM2- RP . . . . .	37
4.5	Analisi ultrastrutturale dei nucleoli di cellule silenziate per PolI . .	38
4.6	Localizzazione di proteine nucleolari in cellule silenziate per PolI . .	39
4.7	Localizzazione di MDM2 in cellule silenziate per PolI . . . . .	40
4.8	Espressione di RP nelle cellule silenziate per PolI . . . . .	40
4.9	Meccanismo di stabilizzazione di p53 indotta dal 5FU . . . . .	41
4.10	Necessità del disequilibrio rRNA-RP per la stabilizzazione di p53 . .	42
4.11	La riduzione contemporanea di rRNA e RP non stabilizza p53 . . .	43
4.12	Il silenziamento di PolI induce un arresto della proliferazione anche in assenza di p53 . . . . .	48
4.13	Efficacia del silenziamento di PolI e RB in cellule HCT116 pBABE e p53DD . . . . .	49
4.14	Importanza di RB e p53 nell'arresto del ciclo cellulare in risposta al silenziamento di PolI . . . . .	50
4.15	Variazioni nella quantità di E2F-1 a seguito del silenziamento di PolI	51

## *ELENCO DELLE FIGURE*

---

4.16 Meccanismi di regolazione dei livelli E2F-1 attivati dal silenziamento di PolI . . . . .	52
--	----

# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 I checkpoints del ciclo cellulare

La progressione della cellula attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare è finemente controllata, cosicché solo quando una fase del ciclo è stata proficuamente completata la cellula può progredire alla fase successiva. La capacità di rallentare o bloccare la progressione nel ciclo cellulare è essenziale al corretto sviluppo degli organismi, in particolare negli organismi pluricellulari l'omeostasi tissutale è mantenuta dalla regolazione di tre fenomeni: la proliferazione, la morte cellulare ed il differenziamento. L'azione delle molecole coinvolte nel controllo di questi processi si esplica in particolari punti del ciclo cellulare chiamati checkpoints, o “punti di controllo”, governati dalle complesse interazioni tra i diversi attori molecolari. L'importanza di tali checkpoints è dimostrata dal fatto che i geni coinvolti nel loro controllo sono frequentemente alterati nelle cellule tumorali, che sono appunto caratterizzate da una incontrollata proliferazione. I due checkpoints più importanti e studiati si trovano alla transizione tra la fase G1 e la fase S (G1/S) e tra la fase G2 e la fase M (G2/M), ma punti di controllo sono presenti anche all'interno della fase S e della fase M. Molte delle proteine con funzione di sensori, mediatori o effettori sono comuni ai diversi checkpoints [1].



## 1.2 Regolazione della progressione nel ciclo cellulare

Le prime proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare sono state identificate negli anni '80 e chiamate cicline, in quanto sintesi, fosforilazione e degradazione di queste proteine avevano un andamento variabile, legato all'avanzare del ciclo cellulare. Oggi questo nome viene dato a proteine che presentano un dominio aminoacidico noto come "cyclin box", responsabile del legame specifico delle cicline ai loro substrati ed inibitori [2]. Le cicline sono caratterizzate in genere da una breve emivita (circa 20 minuti), mentre la loro sintesi e degradazione (proteasoma-dipendente) è strettamente legata alle fasi del ciclo cellulare. Attraverso il dominio "cyclin box" le cicline formano complessi eterodimerici con una classe di serina/treonina (Ser/Thr) chinasi dette chinasi ciclina-dipendenti (CDK), in quanto la loro attività catalitica dipende appunto dal legame con le cicline. Questo legame può non essere altamente specifico: infatti, mentre la ciclina E lega solo CDK2 e la ciclina B solo CDK1, le cicline D possono legare le CDK2, 4, 6, mentre la ciclina A lega sia CDK2 che CDK1. Le CDK sono generalmente più abbondanti delle cicline ed il loro livello è molto più stabile durante tutto il ciclo cellulare. I complessi ciclina-CDK vengono attivati dalla fosforilazione di un residuo Thr nelle CDK altamente conservato e che diviene disponibile per la fosforilazione solo a seguito del legame con la ciclina. La fosforilazione delle CDK dipende dal complesso ciclina H-CDK7, detta anche CAK (Cyclin Activating Kinase): la ciclina H viene espressa a livello costante durante le diverse fasi del ciclo cellulare, essendo necessaria all'attivazione degli altri complessi ciclina-CDK. L'inattivazione dei complessi ciclina-CDK avviene attraverso la fosforilazione di due residui adiacenti treonina e tirosina (T14 e Y15 in CDK1) mediata dalle chinasi Wee1 e Myt1 [3], mentre le fosfatasi della famiglia Cdc25 (Cdc25A, B, e C) defosforilano questi residui, promuovendo quindi la progressione del ciclo cellulare. La ciclina D raggiunge il suo picco d'espressione in fase G1 precoce; con il progredire della fase G1 viene prodotta la ciclina E, la cui funzione è importante per il passaggio alla fase S; con l'ingresso in fase S i livelli di ciclina E cominciano a diminuire, mentre aumenta la ciclina A; infine in fase G2 si ha il picco d'espressione per la ciclina B. La ciclina D integra la risposta proliferativa a segnali mitotici di differente origine

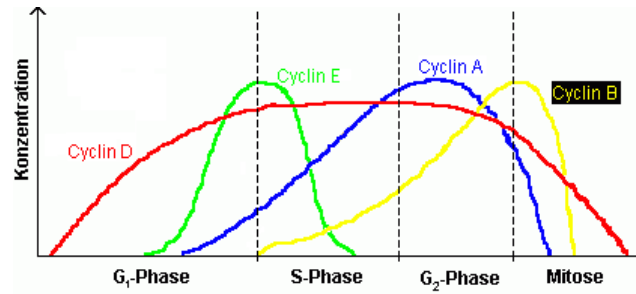


Figura 1.1: Variazioni durante le fasi del ciclo cellulare dei livelli di espressione delle diverse cicline (immagine da “<http://de.wikipedia.org>”)

promuovendo la fosforilazione da parte delle CDK4 e 6 dell'oncosoppressore RB, il quale nel suo stato non-fosforilato/ipofosforilato (possiede più di 15 siti consenso per la fosforilazione) impedisce la progressione alla fase S sequestrando i membri della famiglia di fattori di trascrizione E2F ad azione attivatoria (E2F-1, -2, -3), dai quali dipende la trascrizione di diversi geni necessari all'ingresso nella fase S ed ai processi che in essa avvengono (*i.e.* la replicazione del DNA) [4, 5]. Questi fattori di trascrizione legano specifiche sequenze consenso sul DNA dei geni bersaglio legati in un complesso eterodimerico con i fattori DP-1 e DP-2. Tra i geni bersaglio di E2F vi è anche la ciclina E, la cui sintesi potenzia la fosforilazione di RB, inizialmente mediata dalla sola ciclina D, creando un loop positivo su RB per cui ad un dato momento la quota di E2F che si dissocia da RB iperfosforilato è tale da permettere l'ingresso della cellula in fase S, fase in cui RB è mantenuta nello stato iperfosforilato dai complessi CDK2-ciclina A (anch'essa bersaglio di E2F). Il complesso ciclina A-CDK2 fosforila anche E2F inattivandolo: infatti un improprio mantenimento dell'attività di E2F in fase S porterebbe ad un prolungamento della fase S stessa e all'induzione della morte per apoptosi [6]. L'attività della ciclina B, sintetizzata a partire dalla tarda fase S, è necessaria al superamento della fase G<sub>2</sub> e all'ingresso in fase M. Con l'inizio della fase M, RB viene completamente defosforilata e così si ritrova nel suo stato defosforilato nelle due cellule figlie all'inizio del successivo ciclo cellulare.

L'attività delle chinasi ciclina-dipendenti, e dunque la progressione nel ciclo cellulare, viene regolata negativamente da alcune proteine che agiscono inibendo l'attività enzimatica delle CDK e sono pertanto collettivamente note come CKI (CDK-

Inibitori). Questi inibitori possono essere suddivisi in due famiglie principali: la famiglia INK4, di cui fanno parte  $p15^{INK4b}$ ,  $p16^{INK4a}$ ,  $p18^{INK4c}$  e  $p19^{INK4d}$ , e la famiglia CIP/KIP, di cui fanno parte  $p21^{WAF1}$ ,  $p27^{KIP1}$ ,  $p57^{KIP2}$ . Le due famiglie di CKI agiscono in maniera differente su target diversi: gli INK4, pur essendo regolati in maniera indipendente, agiscono tutti sulle CDK4 e 6, spiazzando in modo competitivo la ciclina D, invece i CIP/KIP possono inibire tutti i complessi ciclina-CDK della fase G1 e S (CDK-cicline D, E ed A) in maniera non competitiva formando un complesso ternario ciclina-CDK-CKI. Successivi lavori scientifici hanno evidenziato come membri di entrambe le famiglie svolgano ruoli inaspettati nella fisiologia della cellula e nel processo di cancerogenesi (vedi le rassegne [7, 8]): ad esempio, bassi livelli di p21 e p27 in effetti promuovono l'attività delle CDK in fase G1, in quanto il legame di p21 e p27 ai complessi ciclina D-CDK pare necessario all'attività catalitica del complesso.

Dei fattori che regolano il ciclo cellulare, gli oncosoppressori RB e p53, prodotti rispettivamente dal gene *RB1* e *TP53*, sono indubbiamente tra i più importanti e studiati. RB, che come detto ha un ruolo cruciale nel controllare l'ingresso in fase S attraverso la regolazione dell'attività di E2F, è codificato dal gene *RB1*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13 (13q14.1-q14.2) ed è stato il primo oncosoppressore ad essere clonato identificando la mutazione presente nei soggetti affetti da retinoblastoma familiare (da cui il nome RB, Retinoblastoma Protein) e, oltre che nel retinoblastoma, lo si ritrova mutato o deletato in un'ampia gamma di neoplasie<sup>1</sup>. Oltre alla più nota attività di regolazione della transizione G1/S, RB regola direttamente anche l'apoptosi [9, 74] ed il differenziamento [11].

Il gene che codifica per p53 si trova sul cromosoma 17 (17p13.1) ed è uno dei geni più frequentemente mutati nei tumori umani<sup>1</sup>. L'oncosoppressore p53 è un fattore trascrizionale localizzato quasi esclusivamente a livello nucleoplasmatico, dove lega il DNA organizzandosi in complessi omotetramerici. In normali condizioni di crescita i livelli di p53 sono mantenuti bassi da un'elevata attività di degradazione proteasoma-dipendente mediata da parte di diverse E3 ubiquitin-ligasi, la più importante delle quali è MDM2. A seguito di stress cellulari di varia natura, le diverse risposte cellulari convergono nello stabilizzare p53 inibendone la degrada-

---

<sup>1</sup>dati dal sito <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

zione. Di seguito p53 attiva la sintesi dei propri geni bersaglio, connessi all'arresto del ciclo cellulare, al riparo del genoma ed alla morte cellulare programmata (nel caso in cui la cellula sia danneggiata irreparabilmente). Tra i geni bersaglio di p53 vi è anche MDM2: in questo modo è p53 stessa a creare un feedback negativo che ne controlla l'attivazione. Attraverso i suoi geni bersaglio, p53 svolge un'azione di controllo sia sulla transizione di fase G1/S che su quella G2/M [12, 13]. In particolare, tra i geni che rispondono maggiormente a p53 vi è il CKI p21<sup>WAF1</sup>, che agisce sul checkpoint G1/S inibendo la fosforilazione da RB. Parallelamente un'incontrollata attività di E2F, spesso conseguente la perdita di RB, è in grado a sua volta di attivare p53 inducendo la sintesi della proteina p14<sup>ARF</sup>, codificata da un frame di lettura alternativo dello stesso locus *INK4a* che codifica p16: ARF agisce sequestrando MDM2 nel nucleolo, dove non può più interagire con p53 [14].

### 1.3 La biogenesi ribosomale

Il nucleolo è una struttura subnucleare priva di membrana ben riconoscibile al microscopio ottico la cui funzione più conosciuta è la sintesi del RNA ribosomale (rRNA) e l'assemblaggio delle proteine ribosomali (RP) con il rRNA neosintetizzato, ovvero la produzione di nuovi ribosomi. L'attività di sintesi del rRNA aumenta col progredire della fase G1, mentre cessa poco prima dell'ingresso della cellula in mitosi, a seguito della dissoluzione della struttura nucleolare, struttura che si ricostituisce nelle cellule figlie attorno a regioni cromosomiche da ciò definite NOR (Regioni di Organizzazione Nucleolare). Le NOR sono presenti a livello delle costrizioni secondarie dei cromosomi acrocentrici (nell'uomo cromosomi 13, 14, 15, 21, 22) e corrispondono ognuna a decine di ripetizioni in tandem del gene codificante il rRNA, chiamato *rDNA* e presente in alcune centinaia di copie nel genoma umano. In interfase i NOR possono essere facilmente valutati mediante una tecnica di colorazione argantica detta AgNOR: ai NOR è infatti associato un gruppo di proteine argirofile che svolgono attività connesse al processo di neosintesi di ribosomi (quali la fibrillarina, la nucleofosmina e la nucleolina), e infatti il numero e le dimensioni dei NOR sono correlati all'attività di biogenesi ribosomale [16].

La microscopia elettronica ha consentito di identificare nel nucleolo interfase tre

componenti morfologiche (vedi Fig.1.2): i centri fibrillari, presenti in numero variabile per ogni nucleolo, attorno ad essi la componente fibrillare densa ed infine la componente granulare. L'organizzazione morfologica riflette i siti del processo di neosintesi dei ribosomi: nei centri fibrillari si trovano i geni del *rDNA* in uno stato cromatinico "aperto", sul confine esterno dei centri fibrillari e nella componente fibrillare vi sono i geni attivamente trascritti e gli rRNA in maturazione, mentre nella componente granulare si associano le RP a formare le particelle pre-ribosomiali, le quali vengono ulteriormente maturate nelle due subunità ribosomiali 40S e 60S ed esportate nel citoplasma (per rassegna vedi [17, 18]). Il rRNA viene trascritto come un lungo precursore detto 47S (vedi Fig.1.3), da cui una serie di tagli successivi eliminano le sequenze trascritte spaziatrici esterne ed interne (ETS ed ITS rispettivamente), producendo le componenti nucleotidiche del ribosoma maturo: 18S nella subunità minore, 28S e 5.8S nella maggiore.

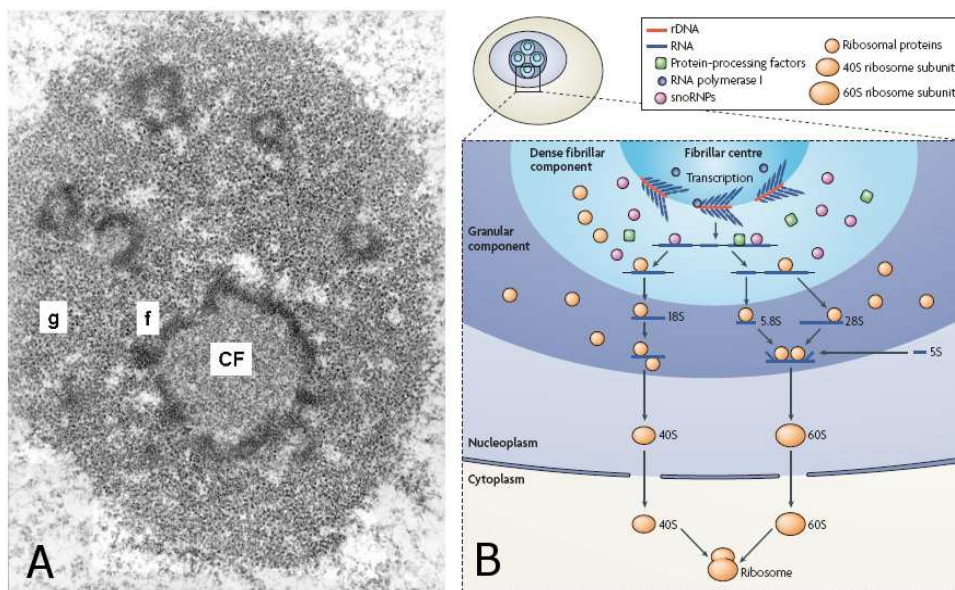


Figura 1.2: Struttura del nucleolo al microscopio elettronico (A): sono ben visibile i centri fibrillari (CF), la circostante componente fibrillare densa (f) e la componente granulare (g).

Schema del processo di sintesi e maturazione di nuovi ribosomi (B) (immagine da [20])

La trascrizione del rRNA avviene esclusivamente ad opera dal complesso del-

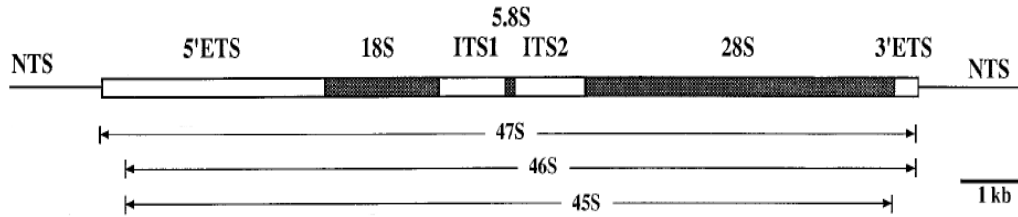


Figura 1.3: Struttura del *rDNA*, il gene codificante il rRNA (modificata da [15])

la RNA Polimerasi I (PolI): inizialmente il rDNA viene legato da un dimero di UBF (Upstream Binding Factor), che recluta il complesso proteico SL1 (Selectivity Factor 1) a formare il cosiddetto complesso di pre-inizio, solo a questo punto viene reclutato il complesso catalitico vero e proprio della PolI (per una rassegna vedi [19]). Va comunque sottolineato che alla costruzione dei ribosomi partecipano tutte e tre le RNA Polimerasi cellulari: infatti se dalla PolI dipende la sintesi del rRNA, le RP sono trascritte dalla RNA Polimerasi II e la componente nucleotidica 5S (presente nel genoma in centinaia di copie organizzate in cluster) dalla RNA Polimerasi III. Oltre che nella biogenesi ribosomale, il nucleolo è recentemente emerso come attore anche in altri processi fisiologici e patologici (riesaminati in [20]), quali il controllo della fine della fase M, l'infezione da parte di lentivirus, la risposta a stress cellulari, in particolare per quanto riguarda l'attività di p53 (argomento trattato più estesamente nella sezione 1.5).

## 1.4 Interazione fra ciclo cellulare e biogenesi ribosomale

Per assicurare alla progenie un adeguato complemento di componenti cellulari, la proliferazione cellulare dovrà necessariamente essere accompagnata da un adeguato aumento della massa della cellula (cioè da un'adeguata “crescita” cellulare) [21]. In particolare l'aumento della componente proteica, che è da considerarsi la componente chiave del processo di crescita cellulare [22], dipende dal potenziamento della capacità di sintesi garantito dalla sintesi di nuovi ribosomi [23]. In effetti la biogenesi ribosomale è il processo energeticamente più dispendioso per cellule in

rapida proliferazione, di cui arriva a drenare l'80% della spesa energetica [24, 25]. Un processo che richiede un tale dispendio energetico dovrà necessariamente essere coordinato con la duplicazione cellulare, e infatti i processi di proliferazione e crescita cellulare sono intimamente connessi e strettamente coordinati, non solo in batteri e lieviti, ma anche in eucarioti superiori (per una rassegna vedi [27]). Ad esempio, nella struttura embrionale che dà origine all'ala della *Drosophila* una classe di mutazioni, note collettivamente come *Minute* e che coinvolgono geni codificanti per RP [26], inducono un fenotipo in cui la ridotta crescita viene compensata da un rallentamento della proliferazione, così da mantenere adeguate dimensioni cellulari; al contrario, le mutazioni di geni della via dE2F/RBF (omologhi rispettivamente a E2F e RB nei mammiferi) inducono una proliferazione incontrollata ed una evidente diminuzione delle dimensioni cellulari [28]. Nel modello murino di delezione inducibile della proteina ribosomale S6, la perdita di questa RP nel fegato impedisce la rigenerazione dopo epatectomia parziale, bloccando il ciclo cellulare prima dell'ingresso in fase S [29]. Dall'entità della biogenesi ribosomale dipende infatti la lunghezza della fase G1, dato che è necessario il raggiungimento di una determinata quantità di ribosomi prima dell'ingresso nella fase S, come dimostrato in cellule derivate da epatoma di ratto in cui la biogenesi ribosomale è stata stimolata mediante insulina o inibita con Actinomicina-D (ActD) [30]. L'ActD è un antibiotico polipeptidico isolato da batteri del genere *Streptomyces* che si intercala al DNA bicatenario impedendo l'elongazione dei trascritti da parte delle RNA Polimerasi: usata in basse dosi (inferiori a 30 nM) inibisce selettivamente la PolII, e dunque la produzione di rRNA [31].

L'inibizione della biogenesi ribosomale induce il blocco delle cellule in fase G1 in quanto attiva il checkpoint G1/S attraverso il pathway p53/p21/RB: infatti è stato dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* che alterazioni della biogenesi ribosomale sono in grado di attivare p53 [32, ölzel, 34, 35]. Tuttavia, poiché inibendo la sintesi di rRNA mediante trattamento con ActD si ha un arresto del ciclo cellulare che dipende equamente sia dalla presenza di p53 che di RB [36], è possibile che siano coinvolti meccanismi diversi dall'attivazione della via p53/p21/RB nella risposta all'inibizione della biogenesi ribosomale. C'è un gnerale consenso sul fatto che i meccanismi molecolari da cui dipende l'attivazione di p53 in presenza di inibizione della biogenesi ribosomale coinvolgono l'inibizione della degradazione di p53 da

parte di RP traslocate nel nucleoplasma dovuta ad uno stress che induce la disgregazione della struttura nucleolare (rimandiamo alla sezione 1.5 per una trattazione più approfondita dell'argomento).

Se la progressione nel ciclo cellulare è dunque controllata dalla biogenesi ribosomale, d'altro canto gli attori che regolano il ciclo cellulare esercitano a loro volta un controllo sulla biogenesi ribosomale: il trattamento di cellule sincronizzate in metafase con roscovitina, un inibitore selettivo delle CDK, impedisce la riorganizzazione del nucleolo e la sintesi del rRNA nella successiva fase G1 [37], mentre l'aumento della sintesi di rRNA durante la fase G1 si è visto dipendere dall'attività di fosforilazione di UBF mediata dalle CDK [38]. Inoltre è stato dimostrato che gli oncosoppressori RB e p53, fattori cruciali nella regolazione del ciclo cellulare (vedi sezione 1.2), agiscono da regolatori negativi della biogenesi ribosomale, inibendo la formazione del complesso di pre-inizio della PolI [39, 40, 41, 42]. Nelle cellule cancerose in cui la funzione di RB e p53 è stata perduta, la proliferazione incontrollata può quindi procedere sostenuta da un aumento della crescita cellulare: in effetti in sezioni derivate da carcinomi della mammella la perdita di RB e p53 è correlata ad un aumento dell'attività nucleolare, valutata morfometricamente mediante colorazione AgNOR [43].

## 1.5 Attivazione di p53 e biogenesi ribosomale

Il prodotto del gene *TP53* svolge un ruolo cruciale nel controllo dell'integrità della cellula, attivandosi in risposta ad un'ampia serie di stimoli nocivi, che in generale inibiscono la degradazione di p53 attraverso diverse modificazioni post-traduzionali [44, 45]. Partendo dal lavoro di Pestov e colleghi del 2001 in cui si dimostrava che l'inibizione della biogenesi ribosomale attiva p53 [32], Rubbi e Millner pubblicarono nel 2003 un lavoro in cui si avanzava l'ipotesi che il “minimo comune denominatore” degli stress capaci di attivare p53 fosse la distruzione dell'integrità nucleolare. A supporto di tale ipotesi, oltre ad una meta-analisi della letteratura che mostrava come gli stress capaci di attivare p53 inducono anche la disgregazione del nucleolo, si dimostrava che un danno al DNA che non coinvolgesse il nucleolo non attivava p53, mentre la microiniezione di anticorpi anti-UBF, inducendo la disgregazione del nucleolo, era in grado di attivare p53 pur in assenza



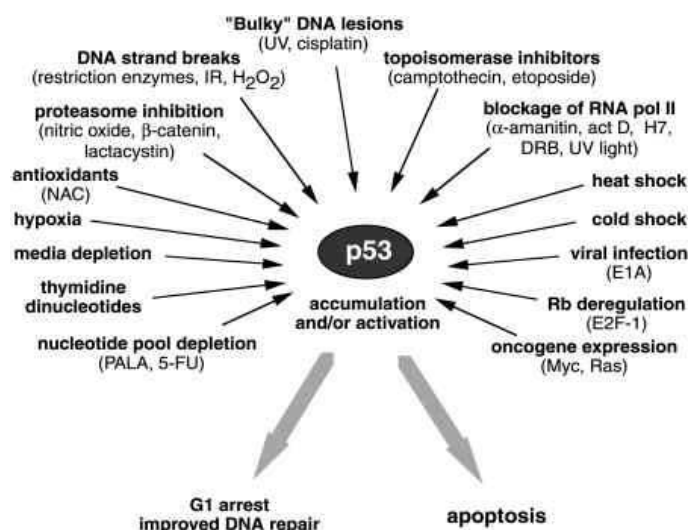


Figura 1.4: Riassunto schematico di stress attivanti p53 (immagine da [44])

di danni al DNA [46]. Restavano da chiarire i meccanismi molecolari attraverso cui la disgregazione del nucleolo determinava l'attivazione di p53. Nello stesso anno furono pubblicati indipendentemente due lavori in cui si dimostrava che la proteina ribosomale L11 era in grado di legarsi a MDM2 ed inibirne l'attività su p53 e che tale legame aumentava in presenza di un blocco della biogenesi ribosomale mediato dalla ActD [47, 48]. Marechal e colleghi, in un lavoro del 1994, avevano già descritto il legame di una RP, L5, a MDM2, proponendo che tale legame riducesse la degradazione di p53 favorendo l'esporto di MDM2 al citoplasma [49]. Oggi invece si è dimostrata un'azione di inibizione diretta di MDM2 da parte di una serie tuttora crescente di RP, tra cui L11, L5, L23 e S7 [50, 51, 52, 53]. In due successivi lavori Lu e colleghi hanno dimostrato che silenziando le RP L11 ed L5 si impedisce la stabilizzazione di p53 indotta dal trattamento con acido micofenolico o 5-Fluorouracile (5FU) [54, 55], farmaci capaci di bloccare la biogenesi ribosomale attraverso l'inibizione, rispettivamente, della sintesi e della maturazione del rRNA [56, 57, 58]. Anche per un'altra proteina nucleolare, la nucleofosmina (NPM), si è dimostrata la capacità di legarsi a MDM2, inibendone l'attività, a seguito della rilocalizzazione della NPM dal nucleolo al nucleoplasma provocato dall'irradiazione con raggi UV [59].

Il modello emerso per spiegare questi risultati è che stress cellulari che bloccano la

biogenesi ribosomale inducono alterazioni nella struttura nucleolare tali per cui vi è un passaggio nel nucleoplasma delle proteine normalmente residenti nel nucleolo (in particolare le RP), le quali attivano p53 attraverso l'inibizione di MDM2.

## Capitolo 2

### SCOPI DELLO STUDIO

Gli scopi del lavoro svolto durante il dottorato di ricerca sono stati:

- approfondire i meccanismi che regolano i livelli di p53 in rapporto alla biogenesi ribosomale;
- valutare l'importanza relativa di RB e p53 nel blocco del ciclo cellulare in presenza di un'inibizione specifica della biogenesi ribosomale.

# Capitolo 3

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Linee cellulari, condizioni di crescita e trattamenti farmacologici

Le linee cellulari di derivazione neoplastica U2OS, HCT116 e MCF7 sono state ottenute dalla collezione ATCC, mentre la linea Phoenix amfotropica è stata selezionata dal laboratorio di Nolan <sup>2</sup> e ci è stata regalata da Kenneth B. Marcu. Tutte le linee cellulari sono state coltivate in monostrato in incubatore a 37°C, in atmosfera unidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le U2OS, le HCT116 e le Phoenix sono state coltivate in terreno DMEM (EuroClone), mentre le le MCF7 in RPMI 1640 (EuroClone), addizionati di siero fetale bovino (FBS; EuroClone) scomplementato al calore (56°C per 30 minuti) al 10%, glutammmina (EuroClone) 2mM, penicillina 100 U/mL e streptomicina 50 µg/mL (EuroClone) diluiti al 1%.

La Actinomicina-D (BioVision) ed il 5-Fluorouracile (Fluorouracile Teva Pharma BV), farmaci impiegati per inibire la biogenesi ribosomale, sono stati utilizzati in concentrazione finale rispettivamente di 10 nM e 75 µM;

La cicloesimide (Sigma-Aldrich) è stata utilizzata in concentrazione di 10 µg/m per valutare l'emivita di p53, mentre quando impiegata in associazione a ActD o 5FU si è utilizzata una concentrazione di 0,25 µg/ml, al fine di inibire la sintesi proteica evitando nel contempo gli effetti della CHX sulla sintesi di rRNA [80].

L'inibitore specifico del proteasoma MG-132 (Calbiochem) è stato utilizzato ad

---

<sup>2</sup><http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>

una concentrazione di 10  $\mu$ M.

L'inibitore di mTOR rapamicina (Cell Signaling Technology) è stato impiegato in concentrazione 10 nM.

Negli esperimenti di privazione di siero, prima di aggiungere il terreno completo contenente FBS allo 0,2% le cellule sono state lavate in PBS.

## 3.2 Trasfezione di RNAi

Le cellule sono state seminate 24 ore prima della trasfezione in terreno senza antibiotici, il giorno seguente il silenziamento è stato ottenuto sostituendo il terreno di crescita con Opti-MEM (Invitrogen) in cui erano stati combinati precedentemente gli RNA interferenti (RNAi) con l'agente trasfettante Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dal produttore; dopo 4 ore, l'Opti-MEM è stato sostituito con l'appropriato terreno di crescita. Per silenziare i geni *POLR1A*, *RB1* sono stati acquistati dei kit Select Stealth RNAi (Invitrogen), comprendenti 3 oligonucleotidi duplex specifici per il gene bersaglio, per silenziare il trascritto del gene *TP53* è stato acquistato il kit Validated Stealth Duopack (Invitrogen), infine per silenziare il gene *RPL11*, codificante la RP L11, si è impiegato un oligo RNA duplex disegnato sulla sequenza specifica del trascritto. Gli RNAi specifici per *RB1* e *RPL11* sono stati usati ad una concentrazione finale 80 nM, mentre quelli per i geni *POLR1A* e *TP53* in concentrazione 40 nM. Per normalizzare gli effetti aspecifici della trasfezione di RNA duplex abbiamo trasfettato i controlli con i kit Invitrogen Stealth RNA Negative Control LO GC e Med GC (cat#12935-200 e -300). La Lipofectamine è stata usata con una proporzione di 1  $\mu$ L ogni 15 picomoli di RNAi.

## 3.3 Trasduzione virale e selezione di cellule stabilmente trasfettate

Virioni contenenti il costrutto retrovirale sono stati prodotti nella linea cellulare di packaging Phoenix Amphotropic, selezionata dal gruppo di Nolan. I plasmidi sono stati trasfettati nelle cellule Phoenix mediante co-precipitazione con

calcio-fosfato, seguendo una versione modificata del protocollo descritto nel sito del laboratorio diretto da Nolan <sup>3</sup>. Le cellule Phoenix sono state seminate in piastra Petri di 10 cm di diametro (precedentemente ricoperte di un sottile strato di gelatina) in 9 mL di terreno; 24 ore dopo in una provetta sono stati preparati 500  $\mu$ L di una soluzione contenente 10  $\mu$ g di DNA plasmidico e 61  $\mu$ L di  $\text{CaCl}_2$  2M, a questa si aggiungono 500  $\mu$ L di soluzione HBS 2X (Hepes 50 mM, KCl 10 mM, destrosio 12 mM, NaCl 280 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5 mM) a pH 7.05, contemporaneamente creando bolle nella provetta per facilitare la formazione di piccoli precipitati di calcio e DNA. Questa soluzione va immediatamente aggiunta goccia a goccia sulla superficie della piastra, assieme a clorochina (che aumenta la penetrazione nelle cellule del DNA) alla concentrazione finale di 25  $\mu$ M. Il terreno va cambiato dopo 8, 24 ore dopo le cellule sono state poste per 6 ore in un incubatore a 32°C, temperatura a cui i virioni sono molto più stabili, quindi il terreno è stato raccolto, filtrato e utilizzato nella seguente infezione virale.

Le cellule HCT116 da infettare sono state seminate in piastra e infettate mediante “spinoculazione”: il terreno contenente i virioni, addizionato di polibrene, è stato aggiunto alle cellule, quindi le piastre sono state centrifugate a 2000 g 32°C per 45 minuti. Il trattamento di spinoculazione è stato ripetuto una seconda volta, quindi le cellule sono state nuovamente messe in incubatore in terreno di crescita. Il costrutto utilizzato, pBABE puro [69], contiene un gene di resistenza alla puromicina, per cui le cellule sono state selezionate in terreno contenente 0,7  $\mu$ g/mL di puromicina, concentrazione sufficiente ad uccidere la linea madre HCT116 in pochi giorni.

### 3.4 Estrazione di RNA totale, sintesi del cDNA e real time PCR

Il reagente TRI Reagent Applied Biosystems (AB) è stato impiegato per l'estrazione del RNA cellulare seguendo il protocollo del produttore (sostituendo però il bromo-cloro-propano con cloroformio). Il RNA così ottenuto è stato risospeso in  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ e quantificato su uno spettrofotometro NanoDrop ND1000, 2  $\mu$ g di

---

<sup>3</sup><http://www.stanford.edu/group/nolan/protocols/prohelperdep.html>

RNA per ogni campione sono stati retrotrascritti a cDNA utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

La valutazione dell'espressione genica mediante real time PCR è stata eseguita su una macchina ABI Prism 7000, utilizzando TaqMan Universal PCR Master Mix (AB) o di Power SYBR green PCR Master Mix (AB) diluite in 20  $\mu$ L di volume totale per pozzetto, ogni lettura è stata ripetuta in triplicato. Sono stati acquistati kit TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), costituiti da una coppia di primers e una sonda FAM/MGB specifici, per quantificare l'espressione dei geni *POLR1A* (cat#Hs00209912\_m1), *RB1* (cat#Hs00153108\_m1), *TP53* (cat#Hs99999147\_m1), *E2F1* (cat#Hs00153451\_m1), *CCNE1* (cat#Hs00233356\_m1) e *TYMS* (cat#Hs00426591\_m1), mentre sono stati valutati mediante SYBR Green real time PCR i livelli del 45S pre-rRNA, utilizzando i primers descritti nel lavoro di Murayama *et al* [81], e dei target di E2F *RRM2* e *MCM7*, i cui primers sono stati disegnati con il software Profinder, disponibile online sul sito Roche <sup>4</sup>. La  $\beta$ -glucuronidasi è stata scelta quale gene di riferimento e valutata mediante kit Applied Biosystems TaqMan Endogenous Control (cat# 4310888E). Tutti i primers sono stati usati ad una concentrazione finale 5  $\mu$ M. Le differenze nell'espressione di questi geni tra i diversi campioni sono state calcolate utilizzando la metodica del  $\Delta\Delta C_t$  descritta nel lavoro di Livak e Schmittgen [82]. Le caratteristiche della corsa di PCR sono state le seguenti per tutte le coppie di primers utilizzate: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, quindi 45 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

### 3.5 Estrazione di proteine ed immunoblot

Per l'estrazione delle proteine cellulari totali, le cellule sono state risospese in un buffer di lisi a pH 7.5 costituito da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, Igepal (NP-40) 1%,  $\beta$ -glicerofosfato 0,1 mM, cocktail di inibitori delle proteasi Complete (Roche) 1X. Dopo 20 minuti in ghiaccio, la frazione insolubile è stata eliminata per centrifugazione a 13000 g per 20 minuti a 4°C; il supernatante è stato recuperato e mantenuto in ghiaccio per la quantificazione mediante metodica di Bradford (uti-

---

<sup>4</sup><http://www.universalprobelibrary.com>

lizzando il Bio-Rad Protein Assay) e stoccato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per essere utilizzato nella corsa elettroforetica in gel denaturante.

La frazione proteica nucleare è stata ricavata con il seguente protocollo: le cellule sono state risospese in buffer ipotonico di (HEPES 10 mM pH 7.9,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, KCl 10 mM ed inibitori delle proteasi 1X) e passate più volte in un ago di siringa; dopo 10 minuti in ghiaccio, si centrifuga a 3000 g per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il surnatante contiene la frazione proteica citoplasmatica e viene scartato, mentre il pellet, contenente la frazione nucleare, viene risospeso in buffer a bassa concentrazione salina (HEPES pH 7.9 20 mM, 25% glicerolo, KCl 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, EDTA 0.2 mM ed inibitori delle proteasi 2X) pari a metà del volume del pellet, immediatamente si aggiunge un pari volume di buffer ad alta concentrazione salina (HEPES pH 7.9 20 mM, 25% glicerolo, KCl 1.2 M,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, EDTA 0.2 mM ed inibitori delle proteasi 2X) e si siringa più volte, poi si lascia in ghiaccio per 30 minuti, vortexando ogni 5-10 minuti la provetta, quindi si centrifuga a 13000 g per 20 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$  e si recupera il surnatante, costituito dalle proteine nucleari pronte per essere quantificate e stoccate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino all'uso.

Per ogni campione, 25  $\mu\text{g}$  di lisato proteico (o 50  $\mu\text{g}$  per valutare proteine poco espresse) sono stati risospesi in buffer di Laemmli e caricati in un pozzetto di un gel di SDS-poliacrilammide al 10% per la corsa elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) in apparato Mighty Small SE 250 GE Healthcare(GE). Successivamente le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond-C extra (GE) in apparato ad immersione TE 22 (GE) in buffer "blotting":  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M a pH 8.8 portato a pH 6.7 con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M.

I filtri in nitrocellulosa sono stati bloccati con latte scremato in polvere disciolto al 5% in TBS-T, ovvero Tris-HCl 20 mM e NaCl 137 mM a pH 7.6 (TBS) e 0,1% di Tween 20 (Sigma) per 1 ora. Di seguito le membrane sono state lavate con TBS-T (2 lavaggi da 5 minuti) e incubate con l'anticorpo primario a  $4^{\circ}\text{C}$  overnight in agitazione. Il giorno successivo le membrane sono state lavate 2 volte in TBS-T per 10 minuti (per eliminare gli anticorpi non legati specificamente), poi incubate per 1 ora a temperatura ambiente (RT) con l'anticorpo secondario perossidasi(HRP)-coniugato diluito in TBS-T e latte 5%; dopo 3 lavaggi da 10 minuti in TBS-T, l'attività della HRP è stata valutata usando il substrato contenuto nel kit di chemiluminescenza ECL (GE) per impressionare delle lastre da chemiluminescenza



Hyperfilm (GE).

L'intensità delle bande impressionate sulle lastre è stata eventualmente quantificata densitometricamente mediante il software GelPro analyzer 3.0 (Media Cybernetics). Gli anticorpi primari utilizzati in immunoblot sono stati: monoclonali murini anti-p53 (clone BP53-12, Novocastra), anti-p21 (clone SX118, Dako), anti-RB totale (clone 1F8, Labvision), anti-phospho-S608-RB (clone 51B7, Labvision), anti- $\beta$ -actina (clone AC-74, Sigma Chemical Company), anti-MDM2 (clone 2A10, Calbiochem) and anti-RP S14 (regalatici da Tim Krüger), anti-E2F-1 (clone KH95, Santa Cruz Biotechnology), policlonali di coniglio anti-RP L11 ed L5 (regalatici da Sinisa Volarevic), policlonali di capra anti-RP L28 (Santa Cruz Biotechnology) ed anti-Lamin-B (Santa Cruz Biotechnology).

### 3.6 Incorporazione di $^3\text{[H]}$ -Uridina e di $^3\text{[H]}$ -Leucina

La  $^3\text{[H]}$ -Uridina è stata aggiunta al normale medium di crescita fino a 2,5  $\mu\text{Ci/mL}$ , quindi le cellule sono state riposte in incubatore per 30 minuti, al termine dei quali l'incorporazione è stata bloccata sostituendo il terreno con PBS freddo in cui era stata disciolta Uridina non radioattiva 1 mM e ponendo le cellule su ghiaccio. Le cellule sono state poi centrifugate e al pellet è stato aggiunto acido perclorico 0,6 N, quindi si vortexa e si centrifuga a 500 g per 10 minuti per lisare le cellule. Il pellet si conserva e si lava in acido perclorico 0,3 N e si ricentrifuga, il pellet va risospeso in KOH 0,3 N e lasciato a 37°C 60 minuti per idrolizzare il RNA. Si aggiunge acido perclorico 6 N fino ad una concentrazione finale 0,8 N, si vortexa e si centrifuga: il surnatante contiene il RNA idrolizzato, che può essere raccolto e letto allo spettrofotometro. La radioattività incorporata nel RNA estratto è stata letta su  $\beta$ -counter Wallac 1414 Liquid Scintillation Counter. La valutazione della sintesi proteica è stata effettuata mediante incorporazione di  $^3\text{[H]}$ -Leucina diluita in terreno di crescita a 9,0  $\mu\text{Ci/mL}$ , lasciando le cellule in incubatore per 30 minuti, al termine dei quali le cellule sono state lavate 3 volte in PBS freddo. Di seguito le cellule sono state lisate, e contemporaneamente le proteine precipitate, direttamente in piastra, mediante aggiunta di acido tricloracetico al 10% freddo e incubazione di 5 minuti in ghiaccio, ripetuta per 3 volte. Le proteine precipitate sono state risospese incubandole in KOH 0,2N per 5 minuti a RT, quindi quan-

tificazione mediante metodo Bradford. La radioattività di questi lisati proteici è stata poi quantificata al  $\beta$ -counter.

### 3.7 Estrazione di RNA nucleare e valutazione del rRNA maturo nucleare

I nuclei delle cellule sono stati ottenuti risospendendo le cellule in buffer di lisi costituito da saccarosio 0,25M, TrisHCl 10 mM a pH 7.4, MgCl 10 mM, Triton X-100 0,5%, e lasciate in ghiaccio per 10 minuti, al termine dei quali sono state potterate in un pestello per ottenere la lisi della membrana plasmatica. Abbiamo valutato al microscopio ottico la rottura della membrana plasmatica nella quasi totalità delle cellule prima di centrifugare a 2000 g per 10 minuti a 4°C e lavare il pellet in saccarosio 0,25M, TrisHCl 10 mM a pH 7.4, MgCl 10 mM per 2 volte. I nuclei così purificati sono stati contati in camera di conta Neubauer colorandoli con Trypan blue: uno stesso numero di nuclei dai diversi campioni è stato lisato in TRI Reagent per estrarre il RNA nucleare, che è stato poi risospeso in H<sub>2</sub>O MilliQ e caricato in un gel di agarosio al 1% per la valutazione densitometrica delle bande corrispondenti agli rRNA 18S e 28S, presenti a livello nucleare solo nei ribosomi nascenti. La quantificazione densitometrica è il risultato di 2 esperimenti indipendenti.

### 3.8 Colorazione al cristal violetto e curve di crescita

Il cristal violetto è una sostanza dal colore viola intenso, usato come colorante nell'industria e nella scienza biomedica, come ingrediente attivo colorazione di Gram e come disinfettante ad uso esterno, infine, essendo capace di legarsi al DNA, si può usare per valutare una popolazione cellulare cresciuta *in vitro* in aderenza. Abbiamo impiegato la colorazione al cristal violetto per valutare il numero di cellule cresciute in piastra: la procedura da noi seguita prevede il lavaggio delle cellule con PBS per 2 volte prima della fissazione in formalina. Dopo almeno 24 ore a 4°C, la formalina viene rimossa mediante 2 lavaggi in acqua distillata (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>),

quindi si procede alla colorazione vera e propria con una soluzione di cristal violetto allo 0,1% in H<sub>2</sub>Od/metanolo 20% per 30 minuti in agitazione a RT. Di seguito le cellule vengono lavate per 4 volte in H<sub>2</sub>Od e sono pronte per essere fotografate. In alternativa si può quantificare allo spettrofotometro la quantità di cristal violetto legato al DNA cellulare, e quindi del numero di cellule, secondo la metodica descritta nel lavoro di Carnero e colleghi [83]. Il protocollo è identico a quanto descritto precedentemente, ma al termine dei lavaggi, dopo aver fatto asciugare completamente le piastre, si solubilizza il cristal violetto in una soluzione di acido acetico al 10% ponendo le piastre in agitazione per 15 minuti a RT. La soluzione di acido acetico, contenente ora anche il cristal violetto, viene recuperata e ne viene letta l'assorbanza sullo spettrofotometro (alla lunghezza d'onda di 595 nm) in triplicato per ogni punto della curva di crescita: l'assorbanza è proporzionale al numero di cellule in quanto dipende dalla quantità di cristal violetto legato al DNA.

## 3.9 Microscopia elettronica

Per la preparazione dei campioni all'analisi ultrastrutturale, le cellule sono state raccolte e pellettate, quindi fissate in paraformaldeide 4% in tampone fosfato 0,1 M a 4°C per 90 minuti, poi lavate in tampone fosfato 0,1 M per 1 ora a RT (stando sempre attenti a non disturbare il pellet cellulare). Le strutture lipidiche cellulari vengono poi colorate con una soluzione di OsO<sub>4</sub> 1% in tampone fosfato 0,1 M a 4°C, di seguito si inizia la disidratazione passando le cellule a intervalli di 15 minuti in etanolo 30%, 50% e 70% e lasciandovele overnight a 4°C. Il giorno successivo si procede la disidratazione passandole in alcol etanologico 96% e 100% e infine in ossido di propilene (2 passaggi da 45 minuti per ognuno), a questo punto si procede all'inclusione in resina epossidica: si inizia l'impregnazione del campione con un mix 1:2 di miscela di Araldite e ossido di propilene, lasciandovelo per 45 minuti, poi si sostituisce con una miscela 2:1 per 1 ora, per finire con miscela di Araldite pura overnight. Il giorno successivo si sostituisce la resina con altra resina pura e si pone il campione a 60°C per almeno 24 ore per far indurire la resina. Dopo aver eliminato la resina che copre il campione incluso, si è proceduto al taglio delle sezioni semifini di 0,5  $\mu$ m di spessore, che sono state poi colorate con blu di

toluidina e osservate al microscopio ottico per verificare la qualità dell'inclusione. A questo punto sono state ottenute le sezioni ultrafini (60-70 nm di spessore), che sono state poi disposte su griglia e colorate in acetato di uranile per 10 minuti e piombo citrato per 5 minuti prima dell'osservazione su un microscopio elettronico a trasmissione Philips 400T.

### **3.10 Tecniche immunocitochimiche e citochimiche**

Le cellule su cui sono state eseguite analisi in immunofluorescenza, immunocitochimica o citochimica sono state tutte seminate su vetrini coprioggetto (22X22 mm) e, al tempo scelto nei diversi esperimenti, sono state fissate e permeabilizzate ponendole in una soluzione di paraformaldeide 2% e Triton X-100 1% in PBS per 4 minuti, al termine dei quali sono state lavate 3 volte in PBS.

#### **3.10.1 Immunofluorescenza e incorporazione di fluorouridina**

Al termine dei lavaggi, i siti di legame aspecifico sono stati saturati con una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) al 1% in PBS per 30 minuti a RT, quindi un ulteriore lavaggio in PBS prima dell'incubazione, in camera umida, overnight e a 4°C, con l'anticorpo primario diluito in PBS-BSA 1%. Il giorno seguente i campioni sono stati lavati 3 volte in PBS-T 0,05%(PBS e Tween 20 allo 0,05%), quindi incubati con l'anticorpo secondario FITC-coniugato policlonale di coniglio anti-mouse F0232 (Dako)(1:250) al buio a 37°C per 45 minuti, al termine dei quali sono stati lavati con PBS altre 3 volte, quindi, dopo un passaggio in H<sub>2</sub>O, i coprioggetto sono stati montati, ed il DNA nucleare marcato con DAPI, mediante il reagente "Pro long antifade reagent with DAPI" (Molecular Probes). I vetrini sono stati poi osservati ad un microscopio a fluorescenza Axiovert 40 (Carl Zeiss). Gli anticorpi primari usati in immunofluorescenza sono stati: anti-Nucleofosmina (clone Fc-61991, Zymed Laboratories), anti-MDM2 (clone SMP14, Santa Cruz Biotechnology), anti-RP S14 (regalatici da Tim Krüger).

Per valutare la neosintesi di rRNA, abbiamo utilizzato una versione modificata della tecnica descritta nel lavoro di Boisvert e colleghi [61], ovvero l'aggiunta al mezzo di crescita di 5-fluorouridina, che viene incorporata nel RNA nascente e permette così la rivelazione in immunofluorescenza dell'entità di neosintesi del RNA: la fluorescenza più intensa si ha a livello nucleolare ed è dovuta all'incorporazione nel rRNA nascente. La principale modifica al protocollo è stata incubare le cellule per 1 ora a 37°C in terreno contenente D-glucosammina 20 mM a pH 7.9, al fine di inibire l'incorporazione di uracile endogeno prima di sostituire il terreno con uno contenente 5-fluoruridina in concentrazione 2 mM, incubando le cellule per 30 minuti in incubatore. Dopo questo tempo, la reazione di incorporazione è stata bloccata mediante lavaggi in PBS freddo e quindi le cellule sono state fissate e preparate per la rivelazione del RNA nascente in immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo monoclonale murino anti-Uridinana alogenata (clone BU-33, Sigma-Aldrich).

#### **3.10.2 Immunoistochimica e incorporazione di bromodesossiuridina**

Abbiamo utilizzato la colorazione immunoistochimica per valutare la progressione delle cellule nella fase S attraverso l'incorporazione di 5-bromo-2-desossiuridina (BrdU). Le cellule sono state coltivate per 2 ore a 37°C in presenza di BrdU 20  $\mu$ M, quindi sono state lavate in PBS e fissate come descritto precedentemente. Per esporre i residui di BrdU incorporati, il DNA è stato denaturato mediante trattamento in HCl 4 N per 10 minuti, di seguito i campioni sono stati lavati in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, quindi si è proceduto all'inibizione dell'attività delle perossidasi endogene mediante trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluata al 1,5% in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) per 5 minuti al buio, terminati i quali i campioni sono stati lavati in PBS e incubati per 30 minuti in PBS-BSA 1% per ridurre eventuali legami aspecifici, poi incubati in camera umida overnight a 4°C con l'anticorpo primario anti-BrdU diluito in PBS-BSA 1%. Il giorno seguente il vetrino viene lavato in PBS, quindi lasciato a incubare con l'anticorpo secondario biotinilato in PBS-BSA 1% per 30 minuti, poi con il coniugato streptavidina-HRP per altri 25 minuti, infine gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante incubazione al buio per 6-10 minuti in diaminobenzidi-

na, diluita in PBS in ambiente debolmente riducente (ottenuto aggiungendo poche gocce di  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in  $\text{H}_2\text{O}$ , prima di procedere alla disidratazione ed al montaggio mediante passaggio sequenziali in etanolo 70%, 96%, 100% e in xilolo prima del montaggio del vetrino sul vetro portaoggetto mediante balsamo di Canada (Sigma).

Il numero di cellule positive sul totale (e quindi la quota di cellule in attiva progressione nella fase S) è stato valutato al microscopio in 10 campi per campione con l'ausilio del software Image-Pro PLUS (Media Cybernetics).

### 3.10.3 Colorazione AgNOR

Le cellule, cresciute su vetrino e fissate come descritto sopra, sono state lavate 3 volte in  $\text{H}_2\text{O}$ , poi colorate con una soluzione di nitrato d'argento ( $\text{AgNO}_3$ ) al 2% in  $\text{H}_2\text{O}$  per 12 minuti a  $37^\circ\text{C}$  al buio. La reazione viene bloccata lavando le cellule in  $\text{H}_2\text{O}$ , quindi le cellule sono state disidratate e montate su vetrino portaoggetto con balsamo di Canada, come descritto sopra.

## 3.11 Co-immunoprecipitazione

Per la co-immunoprecipitazione le cellule sono state risospese in Co-IP buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, 0.8% NP40, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, inibitori delle proteasi 1X) e lasciate in ghiaccio 30 minuti per la lisi, quindi centrifugate a 13000 g per 20 minuti a  $4^\circ\text{C}$ : il surnatante è stato recuperato e quantificato. Per ogni campione, 1,5 mg di proteine sono stati lasciati ad incubare a  $4^\circ\text{C}$  in agitazione overnight con 6  $\mu\text{g}$  di anticorpo primario anti-MDM2 policlonale di coniglio H221 Santa Cruz Biotechnology (SCBT). Per precipitare gli immunocomplessi sono state utilizzate biglie di agarosio legate covalentemente a Proteine A/G (Santa Cruz), precedentemente risospese in Co-IP buffer e bloccate per legami aspecifici da 1 ora a  $4^\circ\text{C}$  in BSA al 5% in Co-IP buffer: le biglie e gli immunocomplessi sono stati incubati in agitazione a  $4^\circ\text{C}$  per 3 ore, dopodichè le biglie sono state centrifugate a 8000 g per 3 minuti e risospese in Co-IP buffer per 4 volte al fine di lavare via eventuali legami aspecifici. Il pellet di biglie è stato

quindi risospeso in Laemmli 2X e caricato in gel di poliacrilammide per la SDS PAGE.

### 3.12 Analisi del ciclo cellulare mediante citometria a flusso

La valutazione della distribuzione nel ciclo cellulare è stata eseguita mediante citofluorimetria secondo il seguente protocollo: le cellule sono state raccolte, centrifugate e risospese in PBS per 2 volte, quindi centrifugate nuovamente e fissate aggiungendo goccia a goccia etanolo freddo al 70%, contemporaneamente vortexando le cellule. I campioni sono stati stoccati a -20°C fino all'analisi al citofluorimetro. Il DNA nucleare è stato marcato mediante Propidio ioduro, quindi le cellule sono state passate attraverso filtri "Filcons" 100 (ConsultS), per eliminare eventuali aggregati, e il loro contenuto in DNA letto su citofluorimetro Partec PAS II (per ogni campione sono state lette almeno 20000 cellule). I dati ottenuti sono stati elaborati con il software Flow Max (Partec) per ottenere la stima della percentuale di cellule in fase G1/G0, S e G2/M in ogni campione analizzato.

Tabella 3.1: Primers usati per la real time PCR

Primers di PCR	Sequenza 5'-3'
45S rRNA Forward	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA
45S rRNA Reverse	AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT
RRM2 Forward	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA
RRM2 Reverse	AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT
MCM7 Forward	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA
MCM7 Reverse	AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT

Tabella 3.2: Sequenze degli RNAi

RNAi	Sequenza 5'-3'
POLR1A-HSS119452 Fw	AUUAGUAAACAUCUGGUCUCCUAGG
POLR1A-HSS119452 Rev	CCUAGGAGACCAGAUGUUUACUAAU
POLR1A-HSS119453 Fw	UUUCCAUGAAGCGCAGGAUGUCCUC
POLR1A-HSS119453 Rev	GAGGACAUCCUGCGCUUCAUGGAAA
POLR1A-HSS119454 Fw	AAGAAAUCUAGAAAGAACACACUGG
POLR1A-HSS119454 Rev	CCAGUGUGUUCUUUCUAGAUUUCUU
RB1-HSS109090 Fw	UCAAGAUUCUGAGAUGUACUUCUGC
RB1-HSS109090 Rev	GCAGAAGUACAUCUCAGAAUCUUGA
RB1-HSS109091 Fw	AUAAAGGUGAAUCUGAGAGCCAUGC
RB1-HSS109091 Rev	GCAUGGCUCUCAGAUUCACCUUUUAU
RB1-HSS109092 Fw	UUCAGUCUCUGCAUGAAGACCGAGU
RB1-HSS109092 Rev	ACUCGGUCUUCAUGCAGAGACUGAA
TP53 RNAi-1 Fw	CCAUCCACUACAACUACAUGUGUAA
TP53 RNAi-1 Rev	UUACACAUGUAGUUGUAGUGGAUGG
TP53 RNAi-2 Fw	CCAGUGGUAAUCUACUGGGACGGAA
TP53 RNAi-2 Rev	UUCCGUCCCAGUAGAUUACCACUGG
L11 RNAi Fw	AAGGUGCGGGAGUAUGAGUUATT
L11 RNAi Rev	UAACUCAUACUCCCGCACCUUTT



# Capitolo 4

## RISULTATI

### 4.1 Inibizione della sintesi del rRNA mediante silenziamento di PolI

Al fine di inibire in modo specifico la sintesi del rRNA, abbiamo deciso di utilizzare degli RNAi per la subunità catalitica della RNA Polimerasi I, chiamata POLR1A. In alcuni lavori pubblicati dal nostro gruppo [30, 36] abbiamo utilizzato l'ActD in dose tali da inibire in modo selettivo la PolI [31], ma, poiché il farmaco lega il DNA in modo aspecifico, abbiamo deciso di evitare il rischio di effetti non specifici utilizzando degli RNAi specifici per il gene *POLR1A*.

D'ora innanzi, per silenziamento di PolI si intenderà silenziamento della subunità catalitica POLR1A.

Per valutare gli effetti del silenziamento di PolI sulla sintesi di rRNA, abbiamo impiegato cellule U2OS (p53+/RB+), derivate da osteosarcoma umano, e HCT116 (p53+/RB+), derivate da carcinoma del colon umano. L'efficacia del silenziamento è stata valutata a livello del trascritto di PolI mediante real time RT PCR, mentre l'attività della proteina è stata analizzata quantificando con diverse metodiche la sintesi di rRNA. Nella linea U2OS, già a 24 ore dalla trasfezione le cellule silenziate per PolI (PolI-) mostrano una riduzione del trascritto di PolI superiore al 80% rispetto ai controlli (SCR), riduzione che si mantiene almeno fino a 96 ore dalla trasfezione (Fig.4.2A). In accordo con la riduzione del messaggero di PolI,

nelle cellule silenziate si ha una forte riduzione anche dei livelli del 45S pre-rRNA già a 24 ore dalla trasfezione, riduzione che si mantiene poi fino a 96 ore dalla trasfezione (4.2B). Anche la quantificazione della sintesi di RNA totale mediante incorporazione di  $^3\text{[H]}$ -Uridina ha mostrato che a 48 ore dalla trasfezione si ha una riduzione circa del 40% della neosintesi di RNA nelle cellule silenziate per PolI (Fig.4.2C), attribuibile al blocco della trascrizione di rRNA. Infine, la sintesi di rRNA è stata valutata visivamente mediante incorporazione di 5-fluorouridina e successiva analisi in immunofluorescenza [61]. A 48 ore dal silenziamento risulta ben visibile una ridotta incorporazione di fluorouridina nei nucleoli delle cellule silenziate per PolI rispetto alle SCR, differenza accentuata a 72 ore: a questo tempo le zone di incorporazione nelle cellule PolI- sono limitate a pochi foci alla periferia nucleolare (Fig.4.2D). La colorazione AgNOR, che permette di visualizzare le proteine argirofile connesse all'attività del nucleolo, rivela chiaramente una loro riduzione nelle cellule silenziate per PolI a 72 ore dalla trasfezione (4.2E). I risultati relativi all'inibizione della sintesi di rRNA a seguito del silenziamento di PolI sono stati confermati utilizzando la linea cellulare HCT116 (dati non mostrati).

#### **4.1.1 Blocco della proliferazione e attivazione della via p53/-p21/RB nelle cellule silenziate per PolI**

Abbiamo valutato gli effetti dell'inibizione della sintesi di rRNA sulla velocità di crescita della popolazione cellulare mediante cristal violetto. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'interferenza di PolI riduce fortemente la crescita della popolazione cellulare (Fig.4.3A). Inoltre abbiamo valutato l'ingresso e la progressione nella fase S delle cellule attraverso l'analisi immunocitochimica dell'incorporazione di BrdU. I risultati hanno evidenziato una notevole riduzione della positività nelle cellule silenziate per PolI a 48 ore dalla trasfezione (Fig.4.3B). Infine abbiamo studiato la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare a 48 ore dalla trasfezione mediante citometria a flusso. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato un accumulo nella fase G1 delle cellule silenziate per PolI rispetto ai controlli (Fig.4.3C). L'analisi mediante incorporazione di leucina triziata non ha rivelato una significativa riduzione nelle cellule silenziate della neosintesi proteica in concomitanza con l'insorgenza dell'arresto del ciclo cellulare (Fig.4.3D), escludendo quindi che

questo dipenda da un difetto nella capacità di sintesi conseguente il blocco della produzione di ribosomi.

Questi dati indicano quindi che il silenziamento di PolI provoca una riduzione della proliferazione cellulare caratterizzato da un blocco del passaggio dalla fase G1 alla fase S. Abbiamo pertanto valutato l'attivazione della via p53/p21/RB, che come detto precedentemente regola l'ingresso nella fase S. L'analisi in immunoblot ha mostrato a partire da 24 ore dalla trasfezione, contemporaneamente al blocco della sintesi di rRNA, un progressivo accumulo di p53 in cellule U2OS silenziate per PolI (Fig.4.3E). Nelle stesse cellule, a 48 ore dalla trasfezione abbiamo osservato che l'accumulo di p53 è accompagnato dalla comparsa del prodotto del suo gene bersaglio p21<sup>WAF1</sup>, e dalla scomparsa della forma iperfosforilata dell'oncosoppressore RB, valutata mediante l'uso di un anticorpo specifico per il residuo Ser608 fosforilato (Fig.4.3F).

#### **4.1.2 Meccanismi di accumulo di p53 nelle cellule silenziate per PolI**

Per quanto riguarda l'attivazione di p53 in presenza di un blocco della biogenesi ribosomale, la letteratura riporta il coinvolgimento di una serie di RP che, in queste condizioni, legano MDM2 inibendone l'attività e stabilizzando così p53. Perciò, abbiamo innanzitutto voluto chiarire se l'accumulo di p53 causato dal silenziamento di PolI dipendesse dal blocco della sua degradazione. Abbiamo perciò valutato l'emivita di p53 attraverso un time course immunoblot per p53 in cellule PolI e SCR in cui la sintesi proteica era stata inibita con cicloesimide (CHX) per 30, 60 e 120 minuti. L'emivita di p53 è risultata essere più che raddoppiata nelle cellule PolI- rispetto ai controlli SCR (Fig.4.4A). Inoltre, il time course immunoblot effettuato in presenza di inibizione della degradazione proteasoma-dipendente mediante trattamento con il farmaco MG-132 ha evidenziato un rapido aumento della quantità di p53 nelle SCR, ma non nelle PolI- (Fig.4.4A), a riprova del fatto che in queste ultime l'attività del proteasoma su p53 è già fortemente inibita.

È stato descritto che il blocco della trascrizione di rRNA con ActD, provocando la segregazione delle componenti nucleolari e la delocalizzazione al nucleoplasma delle RP L5 e L11, stabilizzi p53 attraverso il legame RP-MDM2 [47, 48, 50]. Per veri-

ficare se questo fosse il meccanismo responsabile dell'accumulo di p53 anche nelle cellule silenziate per PolI, a 48 ore dalla trasfezione abbiamo raccolto le proteine cellulari da cellule PolI- e controlli SCR e effettuato una co-immunoprecipitazione della proteina MDM2 per la successiva valutazione in immunoblot della quantità di RP L5 e L11 legate a MDM2. Abbiamo utilizzato cellule HCT116 per questa analisi, in quanto dalla co-immunoprecipitazione effettuata su cellule U2OS non abbiamo ottenuto dati attendibili a causa dei bassi livelli di espressione di MDM2 endogeno. L'immunoblot effettuato sulle proteine co-immunoprecipitate ha rivelato un aumento della proteina L5 legata a MDM2 nelle cellule HCT116 PolI- rispetto alle SCR (Fig.4.4B); purtroppo non è stato possibile valutare anche L11 per problemi tecnici.

Di seguito ci siamo chiesti se questo aumento dell'interazione tra L5 e MDM2 dipendesse da alterazioni nell'integrità della struttura nucleolare. Per valutare morfologicamente i nucleoli delle cellule silenziate per PolI, abbiamo effettuato l'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) a 48 ore dalla trasfezione. Sorprendentemente non abbiamo riscontrato nelle cellule silenziate per PolI alcuna grossolana alterazione morfologica dei nucleoli, i quali non mostravano alcun segno di frammentazione o di segregazione delle componenti principali (centri fibrillari, componente fibrillare e componente granulare) neppure a 96 ore dalla trasfezione (Fig.4.5). I nucleoli delle cellule PolI- appaiono tondeggianti e di piccole dimensioni, con una apprezzabile riduzione della superficie nucleolare rispetto ai controlli SCR, caratteristiche compatibili con una ridotta attività di sintesi, inoltre a 96 ore dalla trasfezione vi è ben evidente una marginazione dei centri fibrillari. A questo punto abbiamo voluto valutare mediante immunofluorescenza (IF) la localizzazione cellulare della proteina nucleolare NPM, usata spesso in letteratura quale marcatore surrogato dell'integrità nucleolare. A 48 ore dalla trasfezione, dunque quando p53 è stata già fortemente attivata, non abbiamo osservato un'apprezzabile delocalizzazione della NPM dai nucleoli nelle cellule silenziate rispetto ai controlli, delocalizzazione invece ben visibile a 96 ore dalla trasfezione (Fig.4.6A). Allo stesso modo, la RP S14, altra proteina a localizzazione nucleolare [60], mostra un forte segnale a livello nucleolare tanto nei controlli SCR quanto nelle cellule PolI- (Fig.4.6B). In definitiva, nelle cellule silenziate per PolI i nucleoli non presentano segni di alterazioni morfologiche, quali

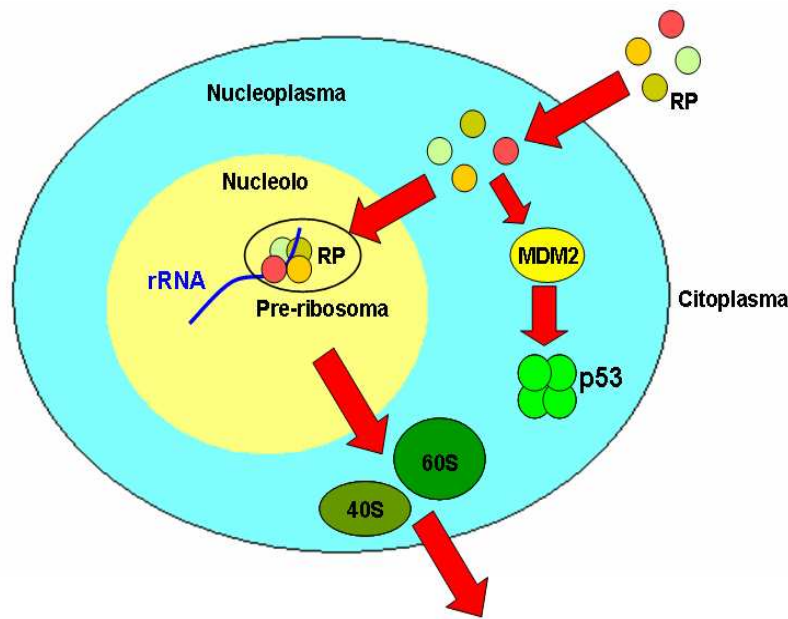
segregazione o frammentazione, ma solo delle dimensioni ridotte rispetto ai controlli, compatibili con la bassa attività di trascrizione del rRNA.

Dato che la struttura nucleare si mostrava integra, abbiamo pensato ad un diverso sistema di stabilizzazione di p53: il sequestro nucleolare di MDM2. Identificato inizialmente come dipendente da ARF [14], il sequestro nel nucleolo di MDM2 è stato successivamente riportato avvenire anche in sua assenza [47, 62]. Abbiamo valutato quindi se il silenziamento di PolI potesse alterare la distribuzione subcellulare di MDM2 anche nelle linee cellulari da noi impiegate, in cui i prodotti del locus *INK4a* non sono espressi. L'analisi in immunofluorescenza della localizzazione di MDM2 in cellule U2OS silenziate per PolI ha rivelato come MDM2 rimanga nel nucleoplasma di queste cellule (Fig.4.7), portandoci ad escludere questo meccanismo di regolazione di p53.

## 4.2 L'equilibrio tra la sintesi di rRNA e di RP controlla p53

Avendo osservato una stabilizzazione di p53 ed un aumento del legame tra L5 e MDM2 nelle cellule silenziate per PolI non associati ad alcun segno evidente di alterazioni dell'integrità nucleolare o delocalizzazione delle proteine nucleolari, non è risultato ad esse applicabile il modello per cui la stabilizzazione di p53 avviene a seguito della disgregazione del nucleolo e del conseguente rilascio delle RP nel nucleoplasma. Abbiamo formulato perciò l'ipotesi che non sia necessaria la disgregazione nucleolare ad attivare p53 attraverso l'interazione RP-MDM2, ma la creazione di un disequilibrio tra sintesi di rRNA e di RP che porti alla mancata incorporazione delle RP nei ribosomi ed al conseguente aumento della loro frazione "libera", in particolare di quelle responsabili dell'inibizione di MDM2, come illustrato in Fig.4.1.

Corollario di questo nuovo modello è che, anche in normali condizioni di crescita, nella cellula esista in ogni momento un equilibrio dinamico tra rRNA e RP a regolare i livelli di p53. Per essere sicuri che ciò che accade nel nostro sistema di inibizione della biogenesi ribosomale mediante silenziamento di PolI corrisponda effettivamente a quanto postulato dal modello del disequilibrio tra rRNA e RP,



male ed attiva p53 in assenza di disgregazione nucleolare [46]. Trattando cellule U2OS con 5FU 75  $\mu$ M abbiamo osservato già dopo 4 ore un forte accumulo di p53 (Fig.4.9A), e pertanto abbiamo deciso di scegliere questo tempo per le successive valutazioni. Per confermare che la produzione di nuovi ribosomi è inibita dal trattamento con 5FU nel nostro sistema sperimentale, abbiamo quantificato densitometricamente il rRNA maturo estratto da uno stesso numero di nuclei di cellule trattate con 5FU e di controlli non trattati. I risultati mostrano che la quantità per nucleo di rRNA maturo è ridotta nelle cellule trattate, in particolare i livelli di 28S rRNA (Fig.4.9B). A questo punto abbiamo valutato l'integrità della struttura nucleolare nelle nostre condizioni sperimentali mediante TEM e IF per la proteina NPM. Abbiamo così confermato l'assenza di alterazioni strutturali a carico del nucleolo conseguenti il trattamento con 5FU (Fig.4.9C e D).

Dunque in presenza di un blocco della biogenesi ribosomale mediata dal 5FU, la stabilizzazione di p53 non necessita della disgregazione del nucleolo, mentre si riporta essere dipendente dal legame a MDM2 delle RP L11, L5 e L23 [54]. L'aumento delle RP libere conseguente al blocco della produzione di rRNA può quindi essere responsabile dell'accumulo di p53. In accordo con questa ipotesi, mentre la quantità di rRNA maturo nucleare è ridotta dal 5FU, l'analisi in immunoblot della quantità di L5 da estratti nucleari, dove dovrebbero risiedere solo le RP neosintetizzate, legate ai pre-ribosomi o libere, non ha rivelato alcuna diminuzione della proteina nelle cellule trattate con 5FU rispetto ai controlli (Fig.4.9E).

#### **4.2.2 “Riequilibrare” la sintesi di rRNA e RP previene l'accumulo di p53**

Partendo dai dati presenti in letteratura che dimostrano come il silenziamento delle RP L5 e L11 prevenga l'accumulo di p53 in cellule trattate con 5FU o ActD [54, 63], abbiamo ipotizzato che fosse possibile prevenire la stabilizzazione di p53 a seguito del blocco della sintesi di rRNA riducendo contemporaneamente la produzione di RP, impedendo così il formarsi di un disequilibrio tra queste due componenti dei ribosomi. Abbiamo perciò impiegato la cicloesimide (farmaco che blocca la elongazione delle proteine nascenti) al fine di “compensare” il blocco della produzione di rRNA dovuto al trattamento con ActD o 5FU attraverso un

contemporaneo blocco della sintesi delle RP. In Fig.4.10A sono presentati gli immunoblot relativi alla quantità di p53 dopo trattamento contemporaneo per 4 ore con ActD10 nM o 5FU 75  $\mu$ M e con cicloesimide in concentrazione di 0,25  $\mu$ g/ml: si può vedere come la sintesi proteica sia necessaria all'accumulo di p53 causato dal blocco della biogenesi ribosomale. Questi risultati, oltre a supportare il modello del disequilibrio rRNA-RP nella stabilizzazione di p53, identificano come tutt'al più marginale il contributo all'accumulo di p53 dato dalle proteine già presenti nel nucleolo e delocalizzate al nucleoplasma a seguito del trattamento con ActD [63]. Per dimostrare in modo più specifico che la stabilità di p53 dipende dall'equilibrio tra rRNA e RP, abbiamo silenziato contemporaneamente L11 e PolI. A 48 ore dalla trasfezione abbiamo validato l'efficacia del doppio silenziamento mediante real time PCR (Fig.4.10B) e raccolto le proteine totali per valutare in immunoblot i livelli di p53. Come si vede in Fig.4.10C, nelle cellule in cui è stato silenziato L11, il silenziamento di PolI non induce alcun accumulo di p53.

Queste conclusioni sono confortate dal fatto che la stabilizzazione di p53 avviene anche in assenza di uno stress nucleolare, come ad esempio a seguito della sovraespressione della RP L5 [50].

### 4.2.3 La riduzione contemporanea di rRNA e RP dovuta a condizioni di crescita restrittive non stabilizza p53

In condizioni di crescita restrittiva (mancanza di segnali di crescita o di nutrienti) viene ridotto tutto il metabolismo cellulare, in particolare sono inibiti i processi di crescita, biogenesi ribosomale *in primis*. In queste condizioni la riduzione della sintesi di rRNA dovrebbe essere associata ad una ridotta sintesi delle RP, e quindi, in accordo a quanto detto precedentemente riguardo alla necessità di uno squilibrio tra queste due componenti per la stabilizzazione di p53, non ci dovrebbe essere alcun accumulo di questo oncosoppressore. Tuttavia, per quanto concerne gli effetti sulla p53 della coltura in terreno povero di siero, la letteratura presenta dati contrastanti [63, 33]. Per chiarire gli effetti della privazione di segnali di crescita, abbiamo coltivato cellule della linea cellulare U2OS in terreno allo 0,2% di siero per 24 ore (STARV). Nelle cellule STARV non si ha alcun accumulo di p53, i cui livelli di espressione sono anzi inferiori a quelli dei controlli coltivati in terreno



al 10% di siero (Fig.4.11A). Neppure dopo 48 ore di crescita in terreno povero di siero si ha alcun accumulo di p53 (dati non mostrati). Nelle cellule STARV si ha una riduzione delle dimensioni nucleolari, come osservato in TEM (Fig.4.11B), e una notevole riduzione della sintesi di rRNA, valutata mediante incorporazione di 5-fluorouridina (Fig.4.11C). A questo punto abbiamo verificato se, oltre alla ridotta sintesi di rRNA, nelle cellule STARV vi fosse anche una riduzione nella quantità di RP. Mentre i livelli di trascritto di L5 e L11, quantificati in real time PCR, non hanno mostrato variazioni di rilievo rispetto ai controlli (Fig.4.11D), l'immunoblot delle proteine totali ha rivelato un netto calo per L5, L11 e per la RP S14 (Fig.4.11E). Volendo confermare che vi fosse un'effettiva riduzione nella sintesi di RP, e non una riduzione dovuta a processi di autofagia dei ribosomi maturi innescati dalla mancanza di siero [64], abbiamo valutato i livelli di L5 e L11 negli estratti nucleari. L'analisi in immunoblot delle RP L5 ed L11 nucleari ha mostrato una forte riduzione di queste proteine nelle cellule STARV, confermando la riduzione della produzione di RP in queste condizioni (Fig.4.11F).

Al fine di validare i risultati ottenuti in una diversa linea cellulare, abbiamo testato gli effetti della privazione di siero anche sulla linea MCF7, linea cellulare umana derivata da carcinoma mammario. Nelle MCF7 abbiamo inoltre simulato la mancanza di nutrienti mediante trattamento di 24 ore con rapamicina (sostanza cui le U2OS si sono dimostrate resistenti) in concentrazione 10 nM. Questo farmaco inibisce la sintesi tanto del rRNA quanto delle RP [65, 66, 67] attraverso l'inibizione selettiva della chinasi mTOR, la quale controlla diversi aspetti del processo di crescita cellulare, integrando i segnali provenienti dall'esterno sulla disponibilità di nutrienti e di fattori di crescita. La valutazione in immunoblot dell'espressione di p53 ha provato che né la privazione di siero, né il trattamento con rapamicina stabilizzano p53 in cellule MCF7 (Fig.4.11G).

Per essere sicuri che la mancata stabilizzazione di p53 nelle cellule sottoposte a privazione di siero o a trattamento con rapamicina non fosse dovuta ad una intrinseca incapacità a produrre p53, abbiamo dato il farmaco ActD (10 nM) alle cellule per le ultime 4 delle 24 ore di coltura in terreno allo 0,2% di siero o di trattamento con rapamicina 10 nM. Il blocco pressoché totale della sintesi di rRNA mediato dalla ActD si è dimostrato perfettamente in grado di stabilizzare p53 nelle cellule U2OS STARV e nelle MCF7 trattate con rapamicina (Fig.4.11H).

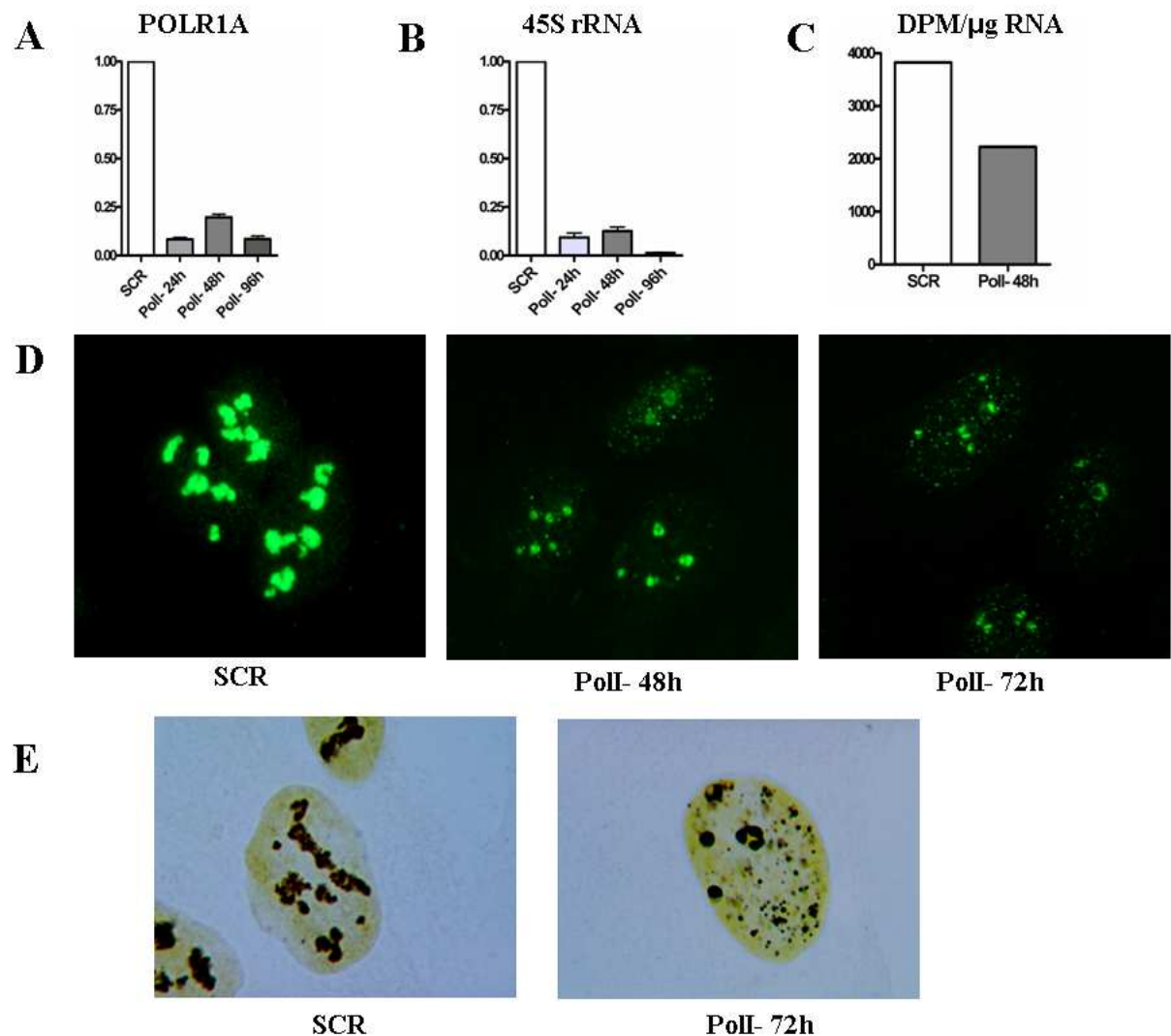


Figura 4.2: Il silenziamento di PolII blocca la sintesi di rRNA.

(A) Abbiamo silenziato la PolII in cellule U2OS. L'efficacia del silenziamento sulla trascrizione di PolII è stata valutata in real time PCR a 24, 48 e 96 ore dalla trasfezione. (B) Analisi dei livelli di espressione del 45S pre-rRNA mediante real time PCR. (C) Analisi della neosintesi di RNA totale mediante incorporazione di  $^3\text{H}$ -Uridina a 48 ore dal silenziamento di PolII. (D) Valutazione morfologica dell'attività nucleolare mediante immunofluorescenza della 5-fluorouridina incorporata nel RNA nascente a 48 e 72 ore dal silenziamento di PolII. (E) Valutazione delle componenti nucleolari argirofile mediante colorazione AgNOR a 72 ore dalla trasfezione.

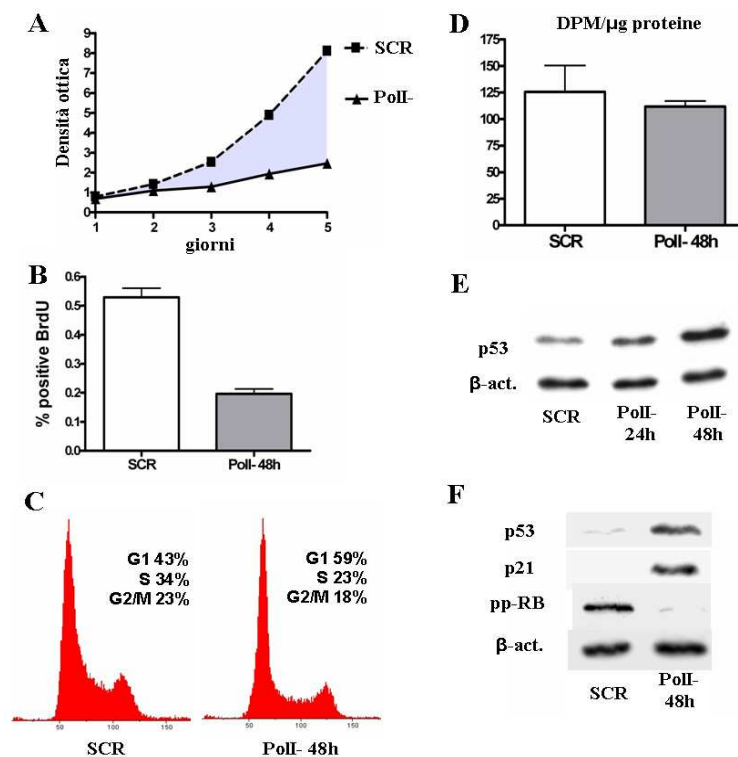


Figura 4.3: Il silenziamento di PolII induce un arresto del ciclo cellulare in fase G1 e l'attivazione della via p53/p21/RB.

(A) La proliferazione cellulare di cellule U2OS silenziate per PolII e dei rispettivi controlli SCR è stata valutata per 5 giorni dopo la trasfezione costruendo una curva di crescita mediante colorazione al cristal violetto e quantificazione spettrofotometrica del colorante legato. (B) Quantificazione mediante immunocitochimica della frazione cellulare positiva per l'incorporazione di BrdU effettuata su cellule U2OS silenziate per PolII e controlli SCR a 48 ore dalla trasfezione. (C) Valutazione della distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare di cellule trattate come in (B) mediante marcatura con propidio ioduro e analisi citofuorimetrica del contenuto nucleare di DNA. (D) Analisi della capacità di sintesi proteica di cellule trattate come in (B) mediante quantificazione della  $^3\text{H}$ -leucina incorporata. (E) Valutazione a 24 e 48 ore dalla trasfezione dei livelli di p53 in cellule U2OS silenziate per PolII e relativo controllo SCR. La proteina  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.) è stata scelta come controllo interno della quantità di proteine caricate. (F) Valutazione in immunoblot dell'attivazione di proteine a valle di p53 a 48 ore dalla trasfezione. Sono stati valutati, oltre all'espressione di p53, i livelli del CKI p21 e la quantità di RB fosforilata (pp-RB) sul residuo S608.

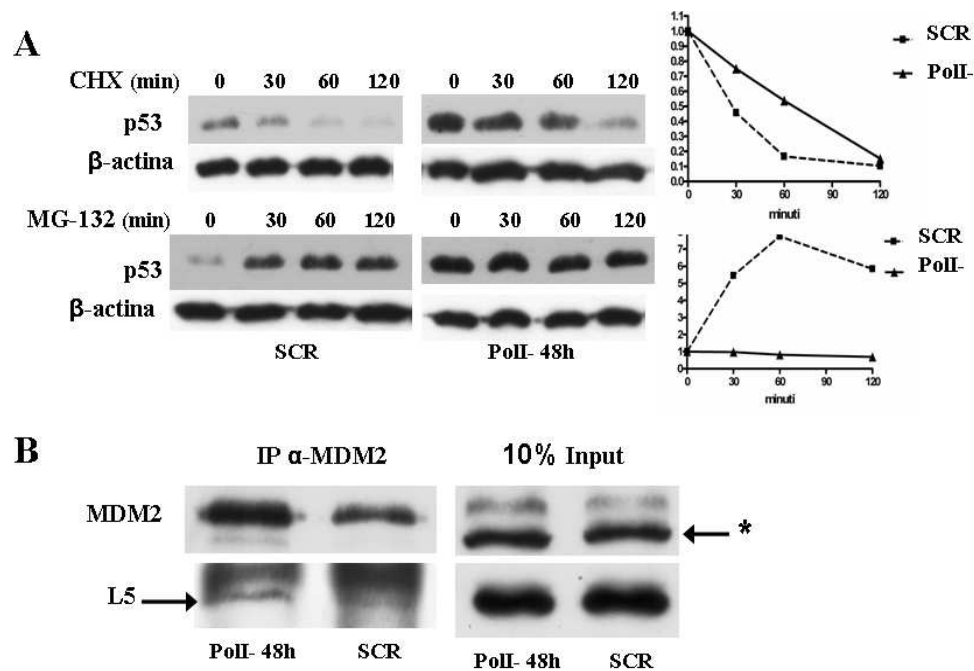


Figura 4.4: Il silenziamento di PolII stabilizza p53 mediante l'interazione RP-MDM2. (A) Immunoblot di p53 in cellule U2OS SCR e silenziate per PolII, trattate dopo 48 ore dalla trasfezione con CHX (10  $\mu$ g/ml) o con MG-132 (10 mM) per i minuti indicati. In grafico sono rappresentati i livelli di p53 normalizzati per la  $\beta$ -actina posti in rapporto alla quantità presente al tempo zero. (B) Utilizzando la linea cellulare HCT116, abbiamo valutato la quantità di RP L5 co-immunoprecipitata ad MDM2. Per ogni campione sono stati utilizzati 1,5 mg di lisato cellulare totale. L'asterisco identifica una banda di aspecificità dell'anticorpo anti-MDM2 impiegato presente nel lisato cellulare totale, ma non nella frazione proteica co-immunoprecipitata ad MDM2.

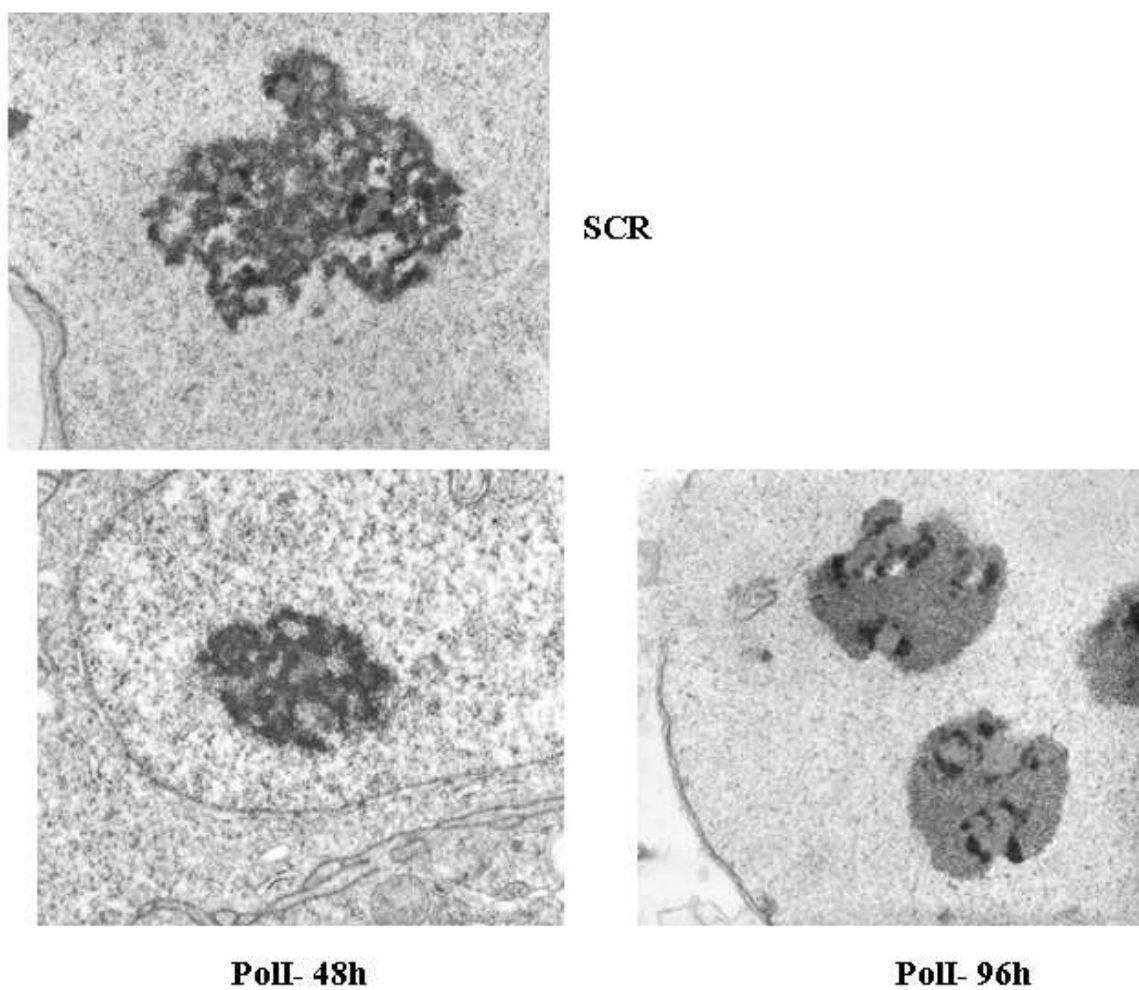


Figura 4.5: L'organizzazione delle tre componenti strutturali del nucleolo non viene alterata a seguito del silenziamento di Poll.

Analisi ultrastrutturale effettuata sulla linea U2OS dei nucleoli di cellule di controllo e silenziate per Poll, a 48 e 96 ore dalla trasfezione.

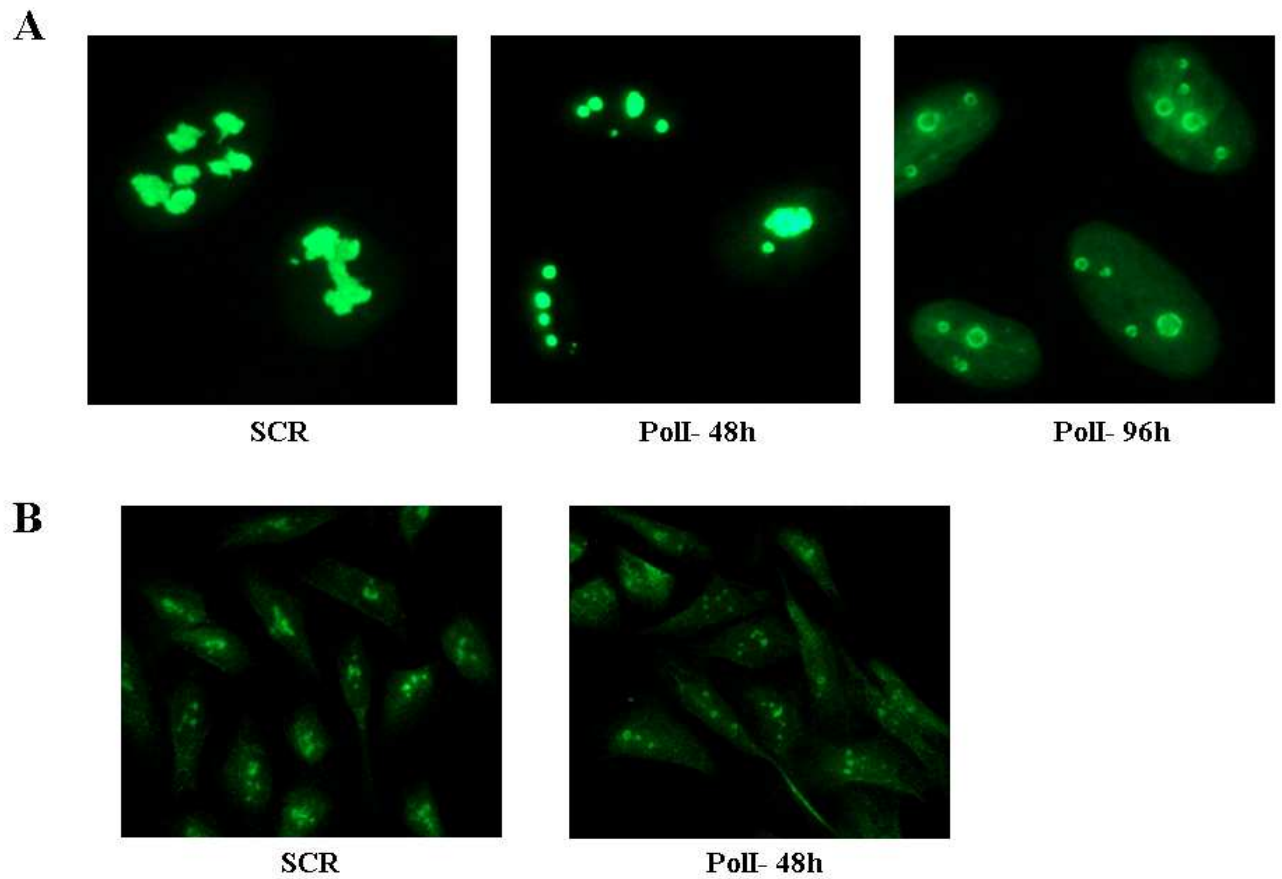


Figura 4.6: Fino a 48 ore dalla trasfezione non vi è delocalizzazione dal nucleolo delle proteine NPM e S14 nelle cellule silenziate per PolI.

(A) Analisi in immunofluorescenza della distribuzione cellulare della proteina nucleolare NPM a 48 e 96 ore dalla trasfezione di RNAi per PolI. (B) Analisi in immunofluorescenza della distribuzione della proteina ribosomale S14 in cellule SCR e PolI- a 48 ore dalla trasfezione.

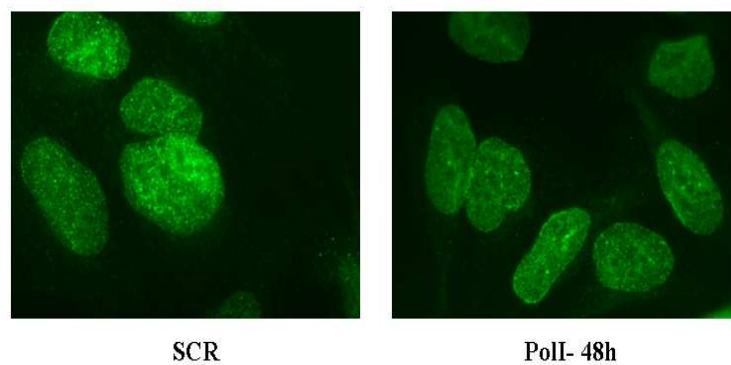


Figura 4.7: La localizzazione di MDM2 rimane nucleoplasmatica dopo silenziamento di PolI. Analisi mediante immunofluorescenza della distribuzione subcellulare di MDM2 in cellule U2OS a 48 ore dalla trasfezione.

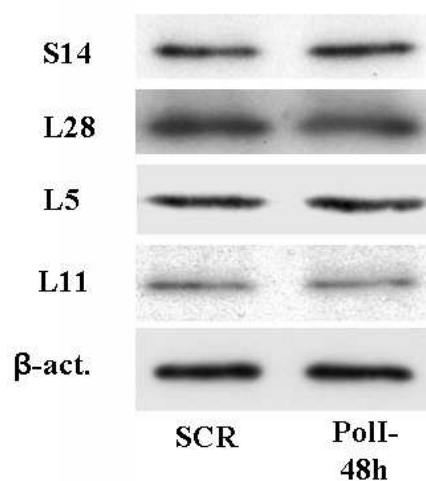


Figura 4.8: La quantità di RP non varia nelle cellule silenziate per PolI. Valutazione in immunoblot dei livelli delle RP S14 della subunità minore del ribosoma e L28, L5 ed L11 della subunità maggiore.

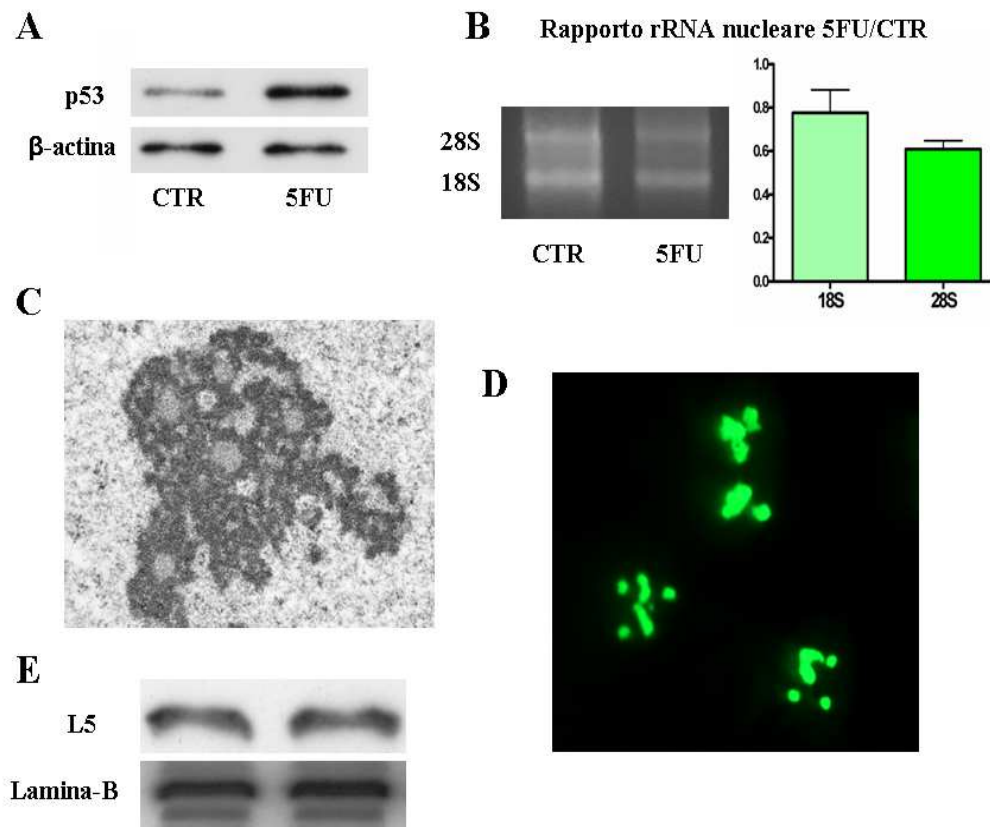


Figura 4.9: Il trattamento con 5FU stabilizza di p53 attraverso un disequilibrio tra la sintesi di rRNA e di RP.

(A) Valutazione dell'espressione di p53 di cellule U2OS dopo 4 ore di trattamento con 5FU 75  $\mu$ M (5FU) e nei relativi controlli non trattati (CTR). (B) Il RNA è stato estratto da uno stesso numero di nuclei di cellule trattate come in (A) per valutare gli effetti del 5FU sulla produzione di ribosomi attraverso la quantificazione densitometrica delle bande di rRNA maturo 18S e 28S. (C) Analisi ultrastrutturale dei nucleoli di cellule trattate per 4 ore con 5FU 75  $\mu$ M. (D) Valutazione della distribuzione cellulare della NPM in cellule trattate come in (A). (E) Livelli nucleari della RP L5 in cellule trattate con 5FU e controlli non trattati; l'espressione di Lamina-B è stata usata come riferimento interno della quantità di proteine caricate.



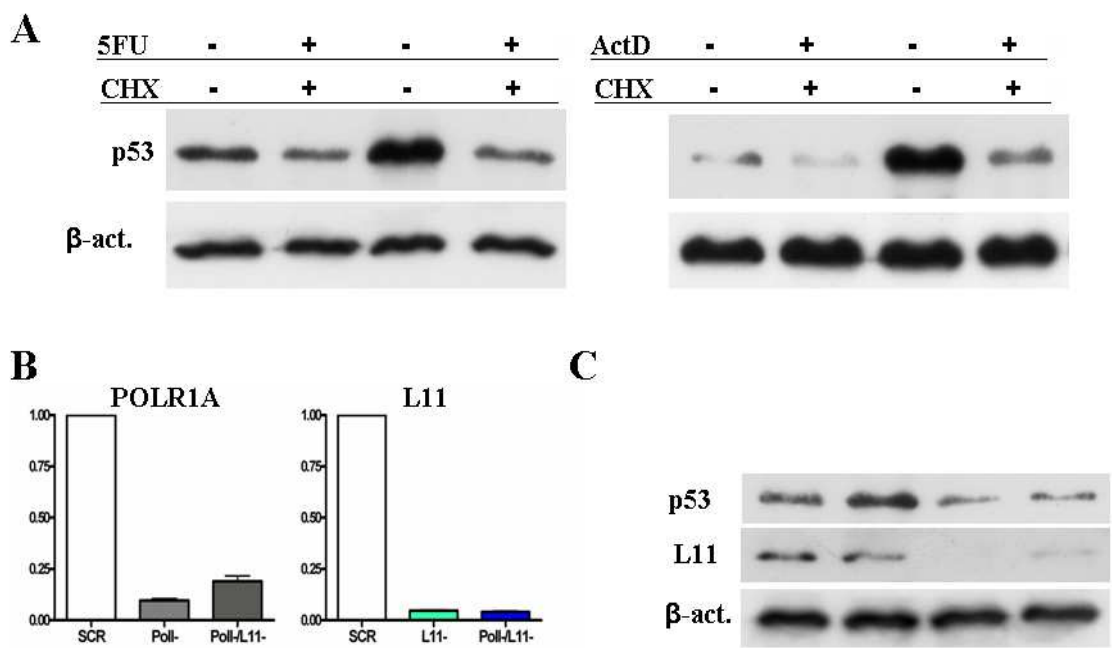


Figura 4.10: La creazione di un disequilibrio tra la sintesi di rRNA e di RP è necessaria alla stabilizzazione di p53.

(A) Valutazione dell'espressione di p53 in cellule U2OS trattate per 4 ore con una combinazione di cicloesimide 0,25  $\mu$ g/ml e 5FU 75  $\mu$ M o cicloesimide 0,25  $\mu$ g/ml e ActD 10 nM. (B) Valutazione mediante real time PCR dell'efficacia del silenziamento di PolI e L11, in singolo o simultaneo, in cellule U2OS a 48 ore dalla trasfezione. (C) Valutazione nelle cellule descritte in (B) dell'espressione di p53 e L11 mediante immunoblot.

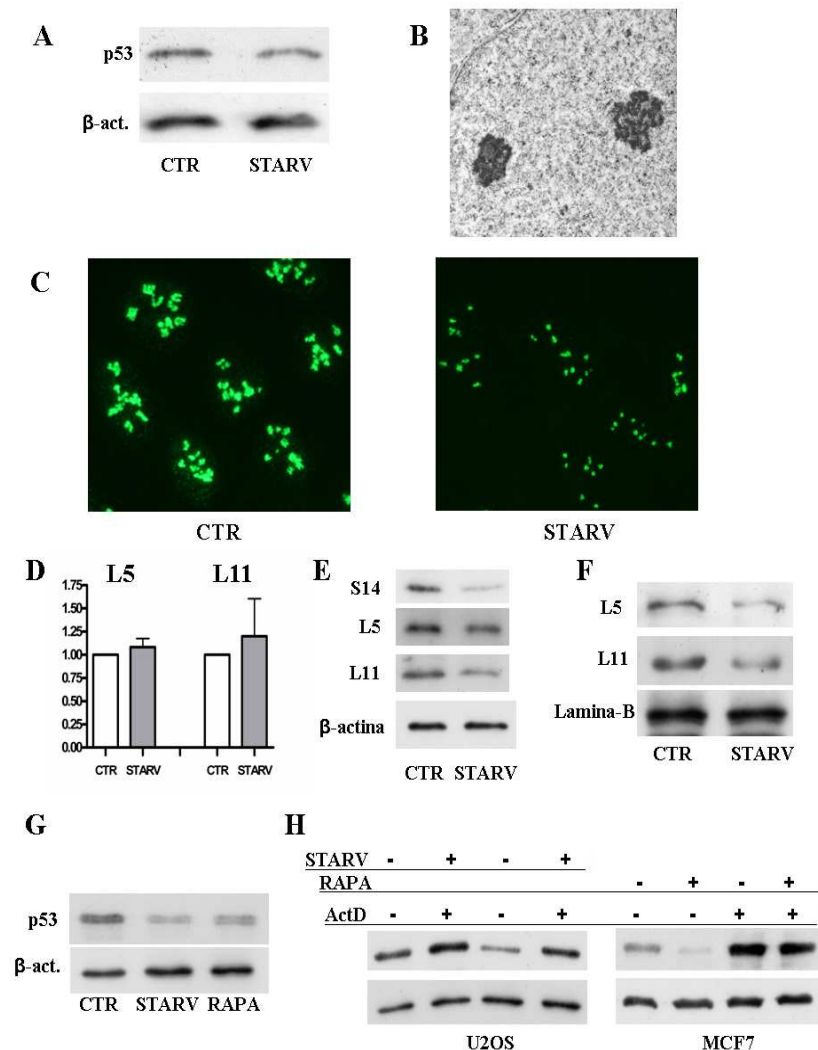


Figura 4.11: Condizioni di crescita restrittive non stabilizzano p53 in quanto provocano una diminuzione contemporanea sia di rRNA che di RP.

(A) Valutazione in immunoblot dell'espressione di p53 in cellule U2OS coltivate per 24 ore in un terreno allo 0,2% di siero (STARV) e nei relativi controlli (CTR). (B) Analisi ultrastrutturale dei nucleoli di cellule STARV. (C) Valutazione mediante incorporazione di 5-fluorouridina della sintesi di rRNA in cellule trattate come in (A). (D) Valutazione mediante real time PCR della trascrizione dei geni codificanti le RP L5 e L11 nelle cellule STARV e CTR. (E) Valutazione della quantità di RP S14, L5 e L11 presenti nei lisati proteici cellulari di STARV e CTR. (F) Valutazione in immunoblot della quantità delle RP L5 e L11 presenti nei nuclei di cellule STARV e CTR. (E) Valutazione della quantità di p53 in cellule MCF7 coltivate per 24 ore in terreno allo 0,2% di siero (STARV) o in presenza di rapamicina 10 nM (RAPA) e di controllo (CTR). (F) Valutazione degli effetti sulla quantità di p53 di un trattamento di 4 ore con ActD 10 nM su cellule U2OS coltivate o meno per 24 ore in terreno allo 0,2% di siero (STARV) e in cellule MCF7 trattate o meno per 24 ore con rapamicina 10 nm (RAPA) per 20 ore.

### 4.3 Ruolo di RB e p53 nell'arresto del ciclo cellulare conseguente il silenziamento di PolI

Come riportato nella sezione 4.1.1, il silenziamento di PolI, provocando uno sbilanciamento fra la sintesi di rRNA e di RP, evoca un blocco del ciclo cellulare attraverso la stabilizzazione di p53, la sintesi di p21 e la conseguente attivazione del checkpoint controllato da RB. Abbiamo a questo punto voluto valutare l'importanza relativa di p53 e di RB nell'induzione di questa risposta.

#### 4.3.1 Importanza di p53 nel blocco del ciclo cellulare nelle cellule silenziate per PolI

Per valutare l'importanza di p53 nel blocco del ciclo cellulare dovuto al silenziamento di PolI, abbiamo interferito contemporaneamente questi due geni in cellule U2OS. L'analisi in real time PCR ha validato l'efficacia del doppio silenziamento sul trascritto di *TP53* e di *POLR1A* (Fig.4.12A), efficacia confermata dall'assenza della proteina p53 nelle cellule p53-/PolI- (e nei relativi controlli p53-) a 48 ore dalla trasfezione (Fig.4.12B). Abbiamo quindi valutato mediante colorazione al cristal violetto la popolazione cellulare a 5 giorni dalla trasfezione di RNAi per p53 e/o PolI. Questo esperimento ha rivelato una forte riduzione della popolazione a seguito dell'interferenza di PolI anche nelle cellule silenziate per p53 (Fig.4.12C). Questi risultati, replicati con successo anche nella linea cellulare HCT116 (Fig.4.12D), dimostrano l'esistenza di un blocco della proliferazione p53-indipendente indotto dal silenziamento di PolI.

#### 4.3.2 Importanza di RB nel blocco del ciclo cellulare nelle cellule silenziate per PolI

Stabilito il ruolo limitato svolto da p53 nel blocco del ciclo cellulare a seguito di inibizione specifica della sintesi di rRNA, abbiamo voluto valutare l'importanza di RB in questa risposta.

Per valutare l'importanza di RB in presenza e assenza di p53 nel blocco del ciclo cellulare conseguente al silenziamento di PolI, sarebbe stato necessario co-

trasfettare RNAi specifici per i 3 diversi geni bersaglio, con plausibili effetti di tossicità aspecifica ed efficienza di silenziamento aleatoria, per inefficiente trasfezione o sovraccarico del complesso cellulare necessario al silenziamento [68]. Al fine di evitare questi problemi abbiamo impiegato due linee cellulari isogeniche, ottenute trasducendo cellule della linea madre HCT116 con il vettore retrovirale pBABEpuro (descritto in [69]) contenente una forma dominante negativa di p53 murina, detta p53DD [70], o con il vettore vuoto come controllo. Le linee cellulari così ottenute, che abbiamo chiamato HCT116 p53DD e HCT116 pBABE (solo p53DD e pBABE d'ora in poi), differiscono solo per la funzionalità di p53. Queste cellule sono state silenziate per RB e/o PolI e l'efficacia del silenziamento è stata validata mediante real time PCR (Fig.4.13A). A 48 ore dalla trasfezione le proteine cellulari totali sono state raccolte e analizzate mediante immunoblot: nelle cellule p53DD si ha sempre un forte accumulo di p53, in quanto la proteina è sequestrata da p53DD in aggregati multimerici non funzionali, come dimostrato dall'incapacità a produrre p21 in risposta al silenziamento di PolI, al contrario delle pBABE, sia RB- che SCR (Fig.4.13B). Per quanto riguarda RB, a seguito del blocco della sintesi di rRNA nelle cellule silenziate per PolI pare esservi una leggera riduzione nella quantità totale della proteina, mentre solo in presenza di p53 funzionale si ha una marcata riduzione della sua forma fosforilata (Fig.4.13B), confermando l'importanza di p53 nell'attivazione di RB attraverso p21 [7].

Avendo così caratterizzato la risposta al silenziamento di PolI nelle p53DD e nelle pBABE, abbiamo valutato la distribuzione e la progressione nel ciclo cellulare dopo silenziamento di PolI in presenza e in assenza della funzione di RB e/o p53. L'analisi citofluorimetrica della quantità di DNA cellulare a 48 ore dalla trasfezione ha mostrato che il silenziamento di PolI induce un accumulo in fase G1 ed una riduzione della fase S sia nelle pBABE che nelle p53DD, per quanto in queste ultime gli effetti siano meno marcati (Fig.4.14A). Al contrario, la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo delle cellule RB-/PolI-, sia pBABE che p53DD, non differisce significativamente da quella dei rispettivi controlli RB- (Fig.4.14A).

Per valutare il superamento del checkpoint G1/S e la progressione nella fase S abbiamo marcato mediante BrdU le cellule proliferanti per le successive colorazione immunocitochimica e conta delle cellule positive. Utilizzando questa tecnica, abbiamo osservato una forte riduzione della proliferazione nelle pBABE PolI- rispetto

alle SCR, mentre non vi erano differenze significative (valutate mediante il test *t* di Student) tra le cellule RB-/PolI- ed i rispettivi controlli RB- (Fig.4.14B). Nelle cellule p53DD l'interferenza di PolI determina una riduzione molto più blanda, ma tuttavia significativa ( $p=0,003$ ), della positività alla BrdU (Fig.4.14B), confermando le osservazioni citofluorimetriche. Anche nelle cellule p53DD la presenza di RB è risultata essenziale al blocco del ciclo cellulare dopo silenziamento di PolI. La proliferazione cellulare è stata testata mediante colorazione al cristal violetto a 5 giorni dalla trasfezione. È risultato evidente che il silenziamento di PolI determina una ridotta proliferazione sia nelle pBABE che nelle p53DD solo in presenza di RB (Fig.4.14C), confermando l'importanza cruciale di questo oncosoppressore nell'arresto del ciclo cellulare in risposta al silenziamento di PolI.

In definitiva, questi risultati dimostrano che RB è essenziale al blocco della progressione del ciclo cellulare a seguito dell'inibizione della sintesi di rRNA, mentre p53 svolge solo un ruolo additivo nel determinare l'arresto del ciclo cellulare. Quindi, mentre l'attivazione del checkpoint controllato da RB a seguito dell'inibizione della biogenesi ribosomale dovuta all'attivazione di p53 è un fenomeno ampiamente descritto, i dati qui presentati identificano per la prima volta la presenza di una via di attivazione collaterale di questo checkpoint indipendente da p53.

### 4.3.3 Il silenziamento PolI determina una riduzione della sintesi di E2F-1

In assenza di p53, il silenziamento di PolI non sembrava indurre l'arresto del ciclo cellulare agendo direttamente su RB: in queste condizioni non abbiamo osservato infatti alcuna riduzione della fosforilazione di RB o un aumento della sua quantità (vedi Fig.4.13B). A questo punto, abbiamo ipotizzato che il meccanismo responsabile dell'arresto del ciclo cellulare potesse agire sul partner molecolare di RB nella regolazione dell'ingresso in fase S, ovvero E2F-1. Abbiamo perciò effettuato un'analisi in immunoblot dell'espressione di E2F-1 a 48 ore dalla trasfezione, analisi che ha rivelato un netto calo della proteina nei campioni in cui PolI era stata silenziata, indipendentemente dalla presenza di p53 funzionale (Fig.4.15A). In effetti, anche il silenziamento di RB si è dimostrato sufficiente di per sé a ridurre

E2F-1, effetto che si riporta dovuto ad un aumento della sua degradazione [71, 72]. Anche nella linea cellulare U2OS il silenziamento di PolI induce una riduzione di E2F-1 (Fig.4.15B), portandoci ad escludere che questi risultati dipendano da peculiarità della linea HCT116.

La Figura 4.15C mostra che solo in presenza di RB la riduzione della quantità di E2F-1 a seguito del silenziamento di PolI porta ad una diminuzione della attività di E2F, valutata quantificando in real time PCR l'espressione di alcuni geni bersaglio di E2F: *CCNE1* (ciclina E), *TYMS*, *RRM2* e *MCM7* [73, 74].

A questo punto abbiamo voluto vedere se la riduzione di E2F-1 nelle cellule silenziate per PolI dipendesse da un aumento della sua degradazione, abbiamo perciò raccolto le proteine dopo aver trattato cellule HCT116 per 7 ore con il farmaco MG-132, così da inibire l'attività del proteasoma da cui dipende la degradazione di E2F-1 [71, 72]. Anche dopo trattamento con MG-132 i livelli di E2F-1 nelle cellule silenziate per PolI sono rimasti molto bassi (Fig.4.16A), suggerendo che la ridotta quantità di E2F-1 dipenda da una riduzione della sua sintesi e non da un aumento della degradazione. Abbiamo perciò valutato l'espressione del messaggero E2F-1 in real time PCR: abbiamo così osservato che il silenziamento di PolI provoca una riduzione del trascritto di E2F-1 sia nelle pBABE che nelle p53DD (Fig.4.16B).

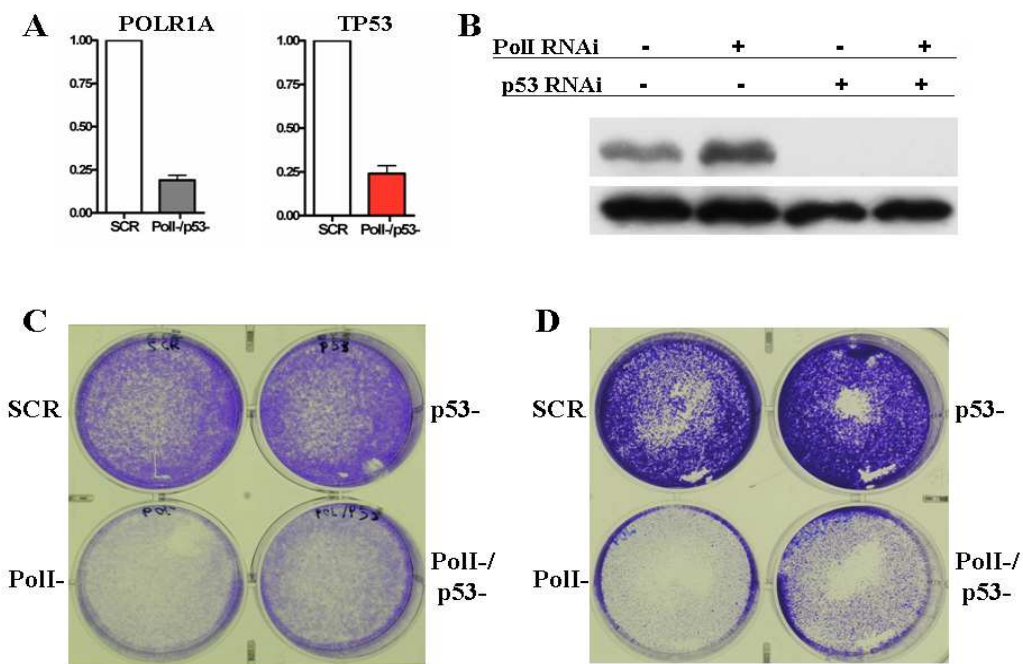


Figura 4.12: Il silenziamento di PolI induce un arresto della proliferazione anche in cellule silenziate per p53.

(A) Validazione dell'efficacia del doppio silenziamento di PolI e p53 in cellule U2OS mediante real time PCR a 48 ore dalla trasfezione. (B) Analisi in immunoblot della quantità di p53 in cellule U2OS silenziate per PolI e/o p53 e nei controlli SCR. (C) Valutazione mediante colorazione con cristal violetto della proliferazione cellulare di cellule U2OS trattate come in (B) a 5 giorni dalla trasfezione. (D) Valutazione della proliferazione cellulare di cellule HCT116 trattate come in (B).

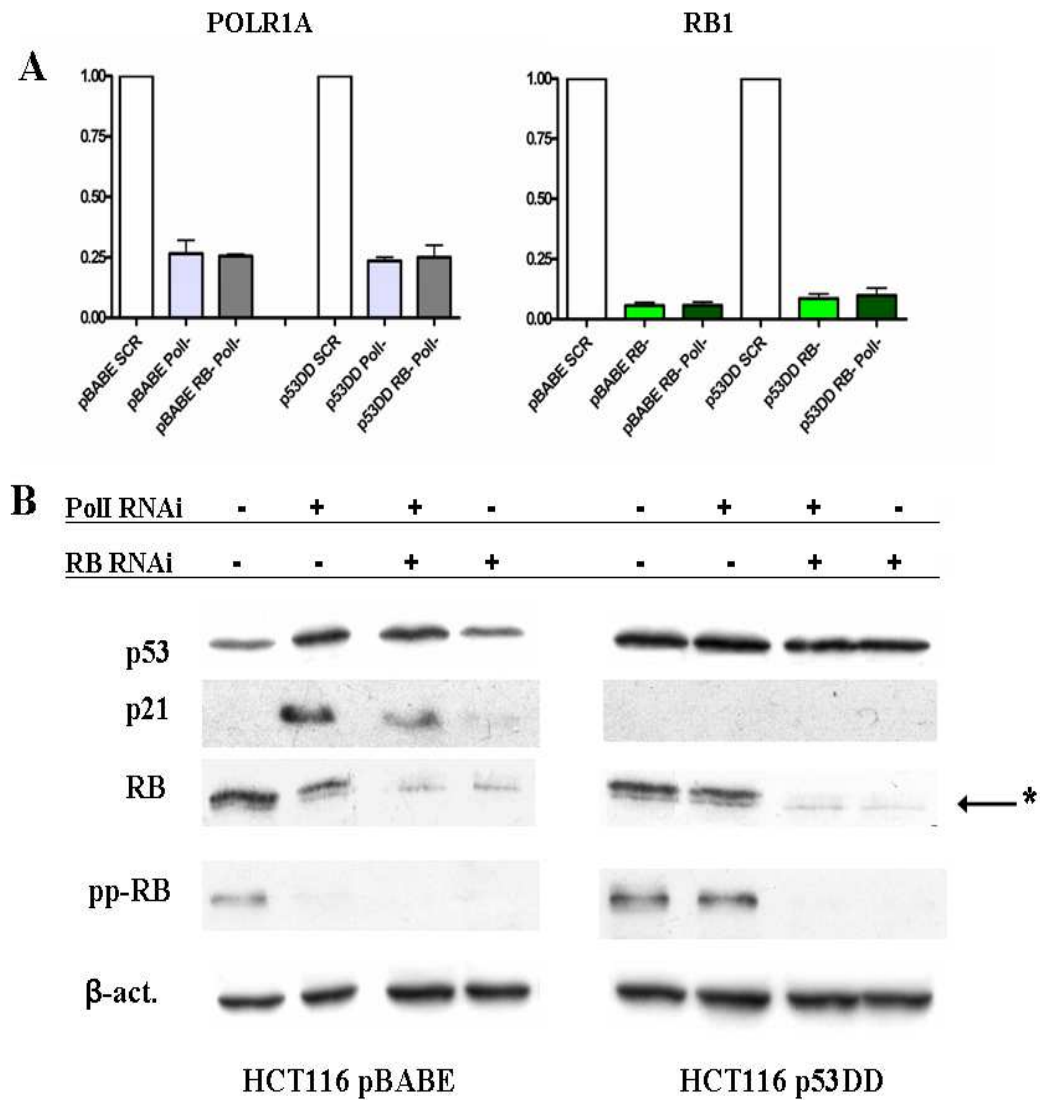


Figura 4.13: Validazione del modello costituito da cellule HCT116 pBABE e p53DD per valutare l'importanza di p53 e RB nella risposta al silenziamento di PolI.

(A) Validazione dell'efficacia del doppio silenziamento di PolI e RB in cellule p53DD e pBABE mediante real time PCR a 48 ore dalla trasfezione. (B) Analisi in immunoblot dell'espressione di p53, p21, RB totale e pp-RB in cellule pBABE e p53DD silenziate per PolI e/o per RB e nei controlli SCR. L'asterisco identifica una banda aspecifica riconosciuta dall'anticorpo anti-RB totale immediatamente adiacente al segnale specifico [85].



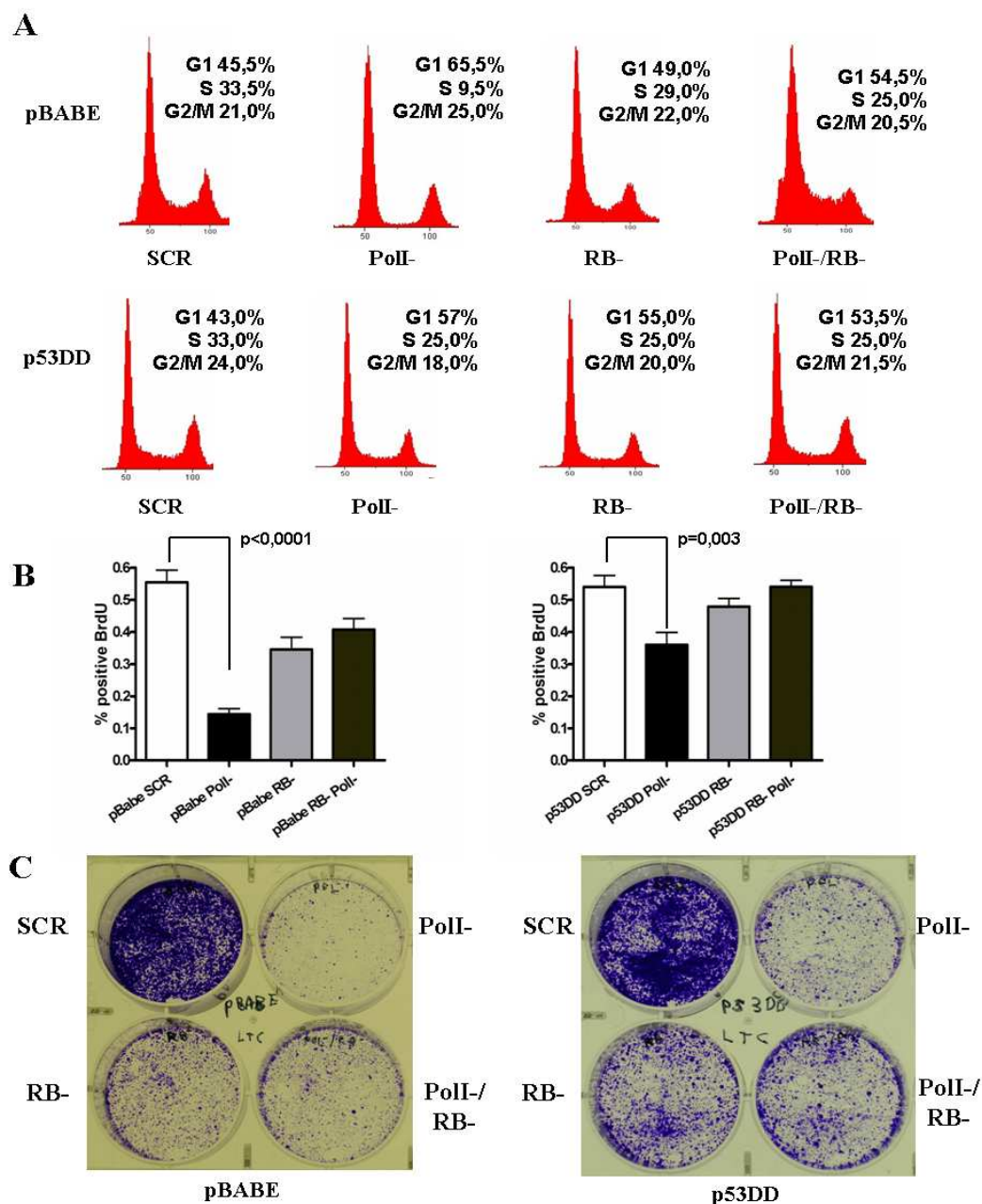


Figura 4.14: Il silenziamento di PolI induce un arresto del ciclo cellulare in fase G1 anche in assenza di p53, ma solo in presenza di RB.

(A) Valutazione mediante citometria a flusso della distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare di cellule pBAbE e p53DD dopo 48 ore dal silenziamento di PolI e/o di RB e nei controlli SCR. (B) Quantificazione della frazione di cellule positive all'analisi immunocitochimica dell'incorporazione di BrdU in cellule trattate come in (A). (C) Valutazione mediante colorazione con cristal violetto della proliferazione cellulare a 5 giorni dalla trasfezione di cellule p53DD e pBAbE di RNAi specifici per PolI, RB, e controlli negativi SCR.

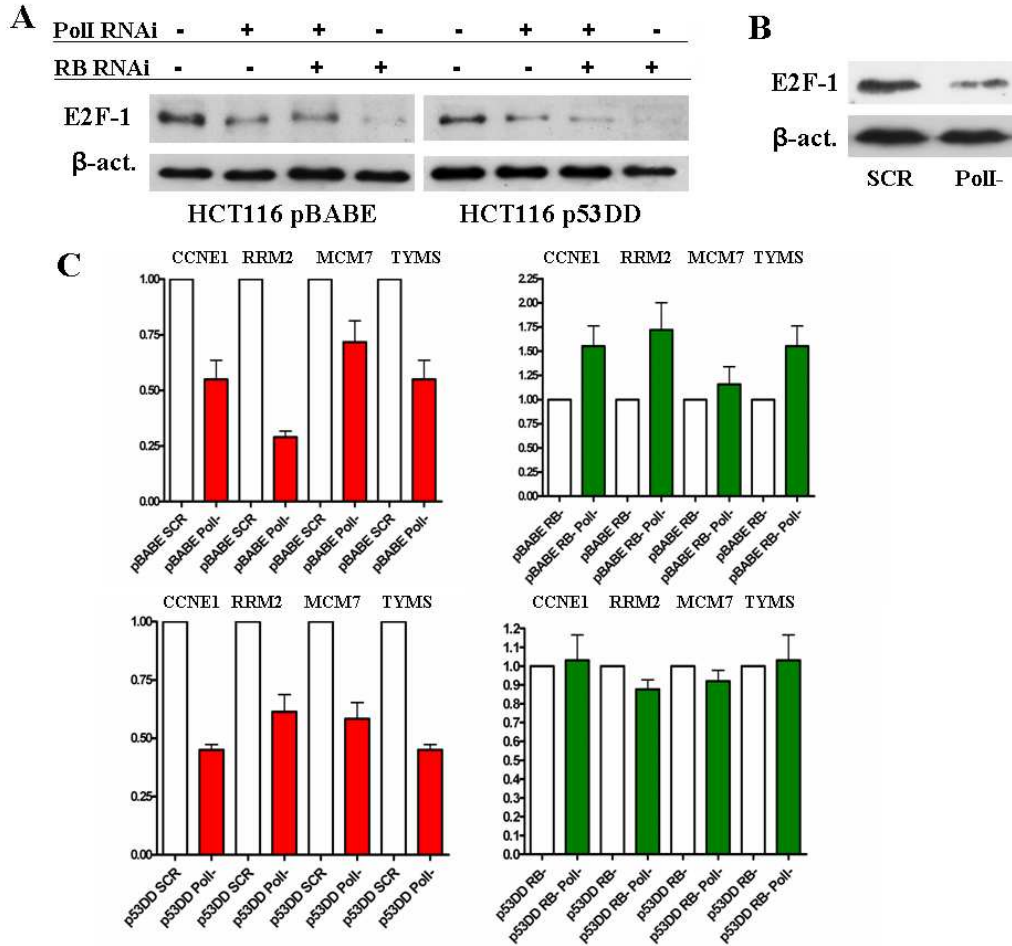


Figura 4.15: Nelle cellule silenziate per PolI si ha una riduzione di E2F-1 indipendente dalla presenza di p53, inoltre la trascrizione di geni bersaglio di E2F è ridotta dal silenziamento di PolI solo in presenza di RB.

(A) Analisi mediante immunoblot dell'espressione di E2F1 in cellule pBABE e p53DD silenziate per PolI e/o RB e nei controlli SCR 48 ore prima della raccolta delle proteine cellulari. (B) Analisi della quantità di E2F-1 in cellule U2OS PolI- e SCR a 48 ore dalla trasfezione. (C) Espressione dei trascritti dei geni bersaglio di E2F-1 *CCNE1*, *RRM2*, *MCM7* e *TYMS* nelle stesse cellule descritte in (A).

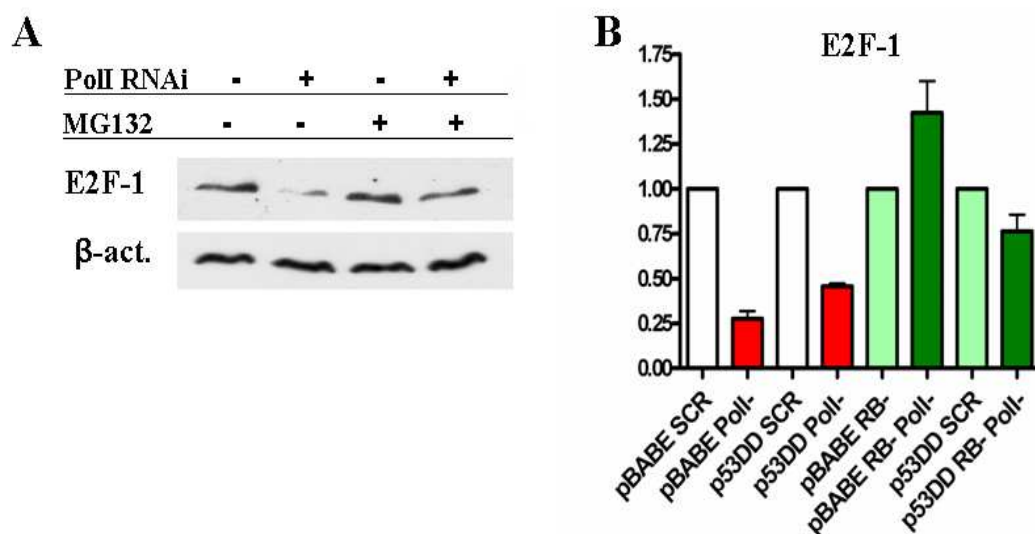


Figura 4.16: Il silenziamento di PolI provoca una riduzione della sintesi di E2F-1 a livello trascrizionale, ma non ne influenza la degradazione. (A) Valutazione in immunoblot dell'espressione di E2F-1 in cellule HCT116 silenziate per PolI o SCR trattate per 7 ore con MG-132 10 mM e controlli non trattati. (B) Valutazione della trascrizione di E2F-1 mediante real time PCR in cellule pBABE e p53DD ilenziate. Nelle cellule silenziate per PolI si ha una riduzione di E2F-1 indipendente dalla presenza di p53, inoltre la trascrizione di geni bersaglio di E2F è ridotta dal silenziamento di PolI solo in presenza di RB.

(A) Analisi mediante immunoblot dell'espressione di E2F1 in cellule pBABE e p53DD ssilenziate per PolI e/o RB e nei controlli SCR a 48 ore dalla trasfezione.

# Capitolo 5

## DISCUSSIONE

### 5.1 Il silenziamento di PolI come mezzo per studiare la relazione tra sintesi di rRNA e la proliferazione cellulare

La relazione che lega la proliferazione cellulare alla biogenesi ribosomale è stata studiata in passato soprattutto attraverso il blocco della sintesi di rRNA mediante inibizione della trascrizione di rRNA con il farmaco Actinomicina-D. È stato riportato che basse dosi di questo farmaco inibiscono selettivamente l'attività trascrizionale della PolI [31, 30]. Bloccando la sintesi di rRNA, l'ActD provoca la segregazione delle componenti nucleolari, il rilascio nel nucleoplasma di proteine residenti nel nucleolo e la stabilizzazione di p53 [46, 47, 48, 63, 51]. Poiché questo farmaco agisce intercalandosi al DNA bcatenario in modo aspecifico, il suo utilizzo non permette di escludere la presenza di effetti aspecifici diversi dall'inibizione della sintesi di rRNA.

Per questa ragione abbiamo deciso di utilizzare come modello di inibizione specifica della trascrizione di rRNA il silenziamento di PolI mediante RNAi. Utilizzando questo sistema, abbiamo dimostrato che nelle cellule silenziate vi è una forte riduzione della produzione di rRNA, accompagnata dall'accumulo di p53 e da un blocco della proliferazione. Quindi l'interferenza del RNA messaggero per PolI determina gli stessi effetti sulla biogenesi ribosomale e sulla proliferazione cellulare di quelli osservati utilizzando altri sistemi per inibire la sintesi di rRNA.

## 5.2 L'inibizione della sintesi di rRNA stabilizza p53 a causa dell'aumentata disponibilità di proteine ribosomali libere

L'analisi morfologica della struttura nucleolare di cellule silenziate per PolI, effettuata mediante analisi ultrastrutturale e citochimica, non ha rivelato alterazioni della normale struttura nucleolare, né delocalizzazione di proteine residenti nel nucleolo. Questi dati sono quindi in contrasto con quelli riportati nella letteratura che indicherebbero nel rilascio delle RP dal nucleolo come conseguenza dell'inibizione della sintesi di rRNA la causa della stabilizzazione di p53, mediata dall'interazione tra alcune di queste proteine e MDM2. Abbiamo perciò ipotizzato che il legame tra MDM2 e le RP non dipendesse dal rilascio di proteine dal nucleolo conseguente alle alterazioni della struttura nucleolare, ma dalla creazione di uno squilibrio tra la produzione di rRNA e di RP, caratterizzato da un aumento della quantità di proteine ribosomali non legate al rRNA che andassero a legarsi a MDM2 inibendo la degradazione di p53. In quest'ottica, abbiamo dimostrato che il farmaco 5FU stabilizza p53 in assenza di alterazioni nucleolari, bloccando la maturazione del rRNA, ma non la produzione di RP. Inoltre, l'accumulo di p53 in cellule in cui la sintesi di rRNA sia stata inibita mediante 5FU o ActD può essere prevenuto inibendo contemporaneamente la sintesi proteica con cicloesimide, al fine di impedire la produzione di RP e la creazione del disequilibrio. Infine, utilizzando un modello più specifico di inibizione simultanea della sintesi di rRNA e RP, silenziando contemporaneamente PolI e L11, abbiamo confermato che l'accumulo di p53 non avviene quando l'inibizione di rRNA non si associa ad un alterato equilibrio con la produzione di RP.

In accordo con il modello proposto, abbiamo quindi osservato che lo spegnimento generalizzato dei processi metabolici in presenza di condizioni di crescita non favorevoli (mancanza di segnali di crescita o di nutrienti) non provoca la stabilizzazione di p53, pur in presenza di una forte riduzione della sintesi di rRNA, in quanto accompagnata da una corrispondente riduzione della sintesi di RP. L'induzione di un ulteriore blocco selettivo della sintesi di rRNA determinava comunque l'accumulo di p53 in queste cellule.

I nostri risultati sono pertanto compatibili con un modello di stabilizzazione di p53 caratterizzato dal fatto che i livelli di questo oncosoppressore sono, in condizioni fisiologiche, mantenuti bassi dal sequestro delle RP neosintetizzate nei ribosomi nascenti, mentre in presenza di un blocco della biogenesi ribosomale il rapido aumento delle RP “libere” nucleari determina un aumento dei livelli di p53 tramite l’inibizione di MDM2. Questo meccanismo di attivazione di p53 offre alla cellula il considerevole vantaggio di basarsi su proteine, le RP, la cui espressione è molto elevata anche in normali condizioni di crescita [25]. Per questa ragione l’inibizione di MDM2 da parte delle RP può attivare la risposta mediata da p53 in presenza di stress genotossici che inducono un blocco della biogenesi ribosomale prima che questi abbiano provocato danni genetici ed indipendentemente da questi.

Siamo consci che l’uso di sole linee cellulari di derivazione neoplastica costituisce un limite del nostro studio. Un lavoro recentemente pubblicato mostra che il blocco della biogenesi ribosomale in neuroni corticali di ratto coltivati *in vitro* induce apoptosi in maniera p53-dipendente [75]. In questo contesto, l’apoptosi indotta dall’inibizione specifica della sintesi di rRNA mediante silenziamento di TIF-IA (un fattore del complesso di pre-inizio necessario all’attività di PolII) era fortemente ridotta dalla somministrazione di cicloesimide. Gli autori hanno ipotizzato che ciò dipendesse dal blocco della sintesi di bersagli pro-apoptotici di p53. Una diversa spiegazione può essere fornita alla luce dei nostri risultati: il trattamento con CHX potrebbe infatti agire prevenendo la creazione del disequilibrio rRNA-RP e così impedire l’accumulo di p53 e la conseguente apoptosi.

### **5.3 Importanza di RB e p53 nell’arresto del ciclo cellulare in risposta all’inibizione della sintesi di rRNA**

Altro obiettivo della presente tesi è stato lo studio dell’importanza relativa di p53 e di RB nell’attivazione del blocco del ciclo cellulare in risposta al silenziamento di PolII, ossia ad un’inibizione specifica della sintesi di rRNA. I risultati ottenuti in quest’indagine hanno dimostrato che, a seguito del silenziamento di PolII, anche in cellule in cui la funzione di p53 sia stata abolita, attraverso la

trasfezione di specifici RNAi o di una forma dominante negativa, si riduceva la proliferazione cellulare per arresto del ciclo cellulare in fase G1. Al contrario, silenziando contemporaneamente RB e PolI la progressione nel ciclo cellulare non era più modificata dall'inibizione della biogenesi ribosomale, indipendentemente dalla presenza di p53.

Questi dati hanno messo in luce l'esistenza di un nuovo meccanismo di attivazione del checkpoint G1/S in risposta alla inibizione della biogenesi ribosomale controllato da RB e indipendente da p53, laddove, in precedenti studi, solo p53 era stato identificato come essenziale per la risposta di arresto del ciclo cellulare in presenza di un'alterazione della biogenesi ribosomale [32, 34, 76]. L'importanza di RB in questa risposta era stata già evidenziata da un nostro precedente lavoro in cui era stato mostrato che il blocco transiente della sintesi di rRNA mediante trattamento di un'ora con ActD a basse dosi induceva un arresto del ciclo cellulare in fase G1 e G2/M dipendente tanto dalla presenza di p53, che da quella di RB [36]. Esistono comunque importanti differenze tra quel sistema sperimentale e quello usato nel presente studio per quanto concerne l'inibizione della sintesi di rRNA: mentre il trattamento di un'ora con ActD induce un'inibizione della sintesi di rRNA molto potente ma transiente, il silenziamento genico mediante RNAi di PolI induce un fenotipo ipomorfo piuttosto spinto e stabile nel tempo per diversi giorni. Oltre ai già ricordati possibili effetti aspecifici della ActD, queste differenze vanno considerate in relazione alle discrepanze nei risultati ottenuti.

Inoltre, l'inibizione specifica della biogenesi ribosomale per delezione del gene *Tif-1A*, codificante la proteina TIF-1A del complesso di pre-inizio che recluta la PolI sul *rDNA*, determina negli embrioni di *Drosophila* un arresto della crescita, con arresto del ciclo cellulare in fase G1 [79]. La delezione dell'omologo di p53 in questi embrioni non modifica il blocco della crescita dovuto all'inibizione della sintesi di rRNA, dimostrando che nella *Drosophila* il blocco della biogenesi ribosomale induce un arresto della proliferazione cellulare indipendente [79].

## 5.4 Ruolo chiave di E2F-1 nell'arresto del ciclo cellulare RB-dipendente a seguito del silenziamento di PolI

Allo scopo di studiare i meccanismi attraverso i quali RB pare essere necessario nel determinare il blocco del ciclo cellulare in maniera p53-indipendente dopo inibizione della biogenesi ribosomale, siamo andati per prima cosa a valutare eventuali variazioni quantitative di RB nelle cellule silenziate per PolI. Poiché non abbiamo osservato alcun aumento di RB, abbiamo valutato i livelli di espressione di E2F-1, il partner molecolare di RB nel controllo dell'ingresso in fase S. L'analisi dell'espressione di E2F-1 ha evidenziato una riduzione della proteina nelle cellule silenziate per PolI indipendente dalla presenza di p53. Alla riduzione dei livelli di espressione di E2F-1 si associava una riduzione dell'espressione di alcuni suoi geni bersaglio.

Per quanto riguarda il meccanismo attraverso cui l'inibizione specifica della sintesi di rRNA mediante silenziamento di PolI riduce i livelli di E2F-1, abbiamo mostrato che questa riduzione non dipendeva da un'aumentata degradazione proteasoma-mediata di E2F-1 trattando le cellule con l'inibitore del proteasoma MG-132. Siamo andati quindi a valutare se la riduzione dei livelli di E2F-1 nelle cellule PolI-fosse dovuta ad una riduzione della sintesi del suo RNA messaggero. L'analisi in real time PCR della quantità del trascritto di E2F-1 ha rivelato una riduzione dell'espressione di questo gene a seguito del silenziamento di PolI, supportando l'ipotesi che l'inibizione della sintesi di E2F-1 sia mediata a livello trascrizionale. Tuttavia, poiché il promotore di E2F-1 risponde a E2F-1 stesso [84], non abbiamo ancora chiarito se questa riduzione del trascritto sia il *primum movens* o sia preceduta da un effetto post-trascrizionale nell'indurre la riduzione di E2F-1 in cellule silenziate per PolI.



## 5.5 Conclusioni

Utilizzando il silenziamento di PolI come metodo per inibire specificamente la trascrizione di rRNA, abbiamo dimostrato che la stabilizzazione di p53 conseguente al blocco della biogenesi ribosomale è dovuta ad una maggiore disponibilità delle RP libere che, non associandosi più al rRNA, vanno ad inibire MDM2.

Inoltre, abbiamo dimostrato che il ruolo centrale di RB nell'arresto della progressione nel ciclo cellulare in cellule in cui sia stata silenziata la PolI. I nostri risultati suggeriscono che l'arresto del ciclo cellulare conseguente l'inibizione della sintesi di rRNA in cellule prive di p53 funzionale sia dovuto ad una ridotta espressione di E2F-1, che, in presenza di RB, non permette il passaggio dalla fase G1 alla fase S.

# Bibliografia

- [1] Lukas J, Lukas C, Bartek J. *Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time*. DNA Repair (AMST) 2004; 3: 997-1007
- [2] Moroy T, Geisen C. *Cyclin E*. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 1424-1439
- [3] Booher RN, Holman PS, Fattaey A. *Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity*. J Biol Chem 1997; 272: 22300-22306
- [4] Chellappan SP, Hiebert S, Mudryi M, Horowitz JM, Nevins JR. *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. Cell 1991; 65: 1053-1061
- [5] Weinberg RA. *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell 1995; 81; 323-330
- [6] Shapiro GI, Harper JW. *Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control*. J Clin Invest 1999; 104: 1645-1653
- [7] Sherr CJ, Roberts JM. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev 1999; 13: 1501-1512
- [8] Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin Pf, Ogara MF. *INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological function*. IUBMB Life; 59: 419-426
- [9] Chau BN, Pan CW, Wang JYJ. *Separation of anti-proliferation and anti-apoptotic functions of Retinoblastoma protein through targeted mutations of its A/B domain*. PLoS ONE 2006; 1: e82

- [10] Young AP, Longmore GD. *Differential regulation of apoptotic genes by Rb in human versus mouse cells*. Oncogene 2004; 23: 2587-2599
- [11] Pajalunga D, Camarda G, Crescenzi M. *pRB in the differentiation of normal and neoplastic cells*. "Rb and tumorigenesis" 2006; Capitolo 2: 11-19
- [12] Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. *Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53*. Oncogene 1995; 10: 109-115
- [13] Giono LE, Manfredi JJ. *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. J Cell Physiol 2006; 209: 13-20
- [14] Bates S, Philips AC, Clarke PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH. *p14<sup>ARF</sup> links the tumor suppressor RB and p53*. Nature 1998; 395: 124-125
- [15] Dundr M, Olson MOJ. *Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis*. Mol Biol Cell 1998; 9: 2407-2422
- [16] Derenzini M. *The AgNORs*. Micron 2000; 31: 117-120
- [17] Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. *Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus*. J Histochem Cytochem 2006; 54: 131-145
- [18] Tschochner H, Hurt E. *Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm*. Trends Cell Biol 2003; 13: 255-263
- [19] Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V. *A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis*. Cell Mol Life Sci 2007; 64: 29-49
- [20] Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 574-585
- [21] Thomas G. *An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation*. Nat Cell Biol 2000; 2: E71-E72

- [22] Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-608
- [23] Peculis BA. *Ribosome biogenesis: ribosomal RNA synthesis as a package deal*. *Curr Biol* 2002; 12: R623-624
- [24] Schmidt EV. *The role of c-myc in cellular growth control*. *Oncogene* 1999; 18: 2988-2996
- [25] Warner JR. *The economics of ribosome biosynthesis in yeast*. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 437-440
- [26] Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, Harrison PM, Yu Z, Kenmochi N, Kaufman TC, Leever SJ, Cook KR. *The ribosomal protein genes and Minute loci of Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 2007; 8: R216
- [27] Rudra D, Warner JR. *What better measure than ribosome synthesis?*. *Genes Dev* 2004; 18: 2431-2436
- [28] Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 1998; 93: 1183-1193
- [29] Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilbermann F, Terracciano L, Montini E, Grompe M, Kozma SC, Thomas G. *Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6*. *Science* 2000; 288: 2045-2047
- [30] . *Key role of the achievement of an appropriate ribosomal RNA complement for G1-S phase transition in H4-II-E-C3 rat hepatoma cells*. *J Cell Physiol* 2005; 202: 483-491
- [31] Dousset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D, Huang S. *Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription*. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 2705-2717
- [32] Pestov G, Strezoska Z, Lau LF. *Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G1/S transition*. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4246-4255

- [33] Hölzel M, Rohrmoser M, Schlee M, Grimm T, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hiddemann W, Bornkamm GW, Eick D. *Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation.* J Cell Biol 2005; 170: 367-378
- [34] Sulic S, Panic L, Barkic M, Mercep M, Uzelac M, Volarevic S. *Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response.* Genes Dev 2005; 19: 3070-3082
- [35] Panić L, Tamarut S, Sticker-Jantscheff M, Barkić M, Solter D, Uzelac M, Grabusić K, Volarevic S. *Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation.* Mol Cell Biol 2006; 26: 8880-8891
- [36] Montanaro L, Mazzini G, Barbieri S, Vici M, Nardi-Pantoli A, Govoni M, Donati G, Treré D, Derenzini M. *Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines.* Cell Prolif 2007; 40: 532-549
- [37] Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. *Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus.* J Cell Biol 2002; 156: 969-981
- [38] Voit R, Hoffmann M, Grummt I. *Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF.* EMBO J 1999; 18: 1891-1899
- [39] Budde A, Grummt I. *p53 represses ribosomal genes transcription.* Oncogene 1999; 18: 1119-1124
- [40] Zhai W, Comai L. *Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53.* Oncogene 2000; 19: 3487-3497
- [41] Voit R, Schafer K, Grummt I. *Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein.* Mol Cell Biol 1997; 17: 4230-4237
- [42] Hannan KM, Hannan RD, Smith SD, Jefferson LS, Lun M, Rothblum LI. *Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1.* Oncogene 2000; 19: 4988-4999

- [43] Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. *Nucleolar size and activity are related to pRB and p53 status in human breast cancer*. J Histochem Cytochem 2004; 52: 1601-1607
- [44] Ljungam M. *Dial 9-1-1 for p53: mechanism of p53 activation by cellular stress*. Neoplasia 2000; 2: 208-225
- [45] Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. *Stress signals multiple pathways to stabilize p53*. Mol Cell Biol 2000; 20: 3224-3233
- [46] Rubbi CP, Milner J. *Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses*. EMBO J; 22: 6068-6077
- [47] Lohrum MAE, Ludwig RL, Kubbutat MHG, Hanlon M, Vousden KH. *Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11*. Cancer Cell 2003; 3: 577-587
- [48] Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhardt WA, Xiong Y. *Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates p53-dependent ribosomal-strss checkpoint pathway*. Mol Cell Biol 2003; 23: 8902-8912
- [49] Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ. *The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes*. Mol Cell Biol 1994; 14: 7414-7420
- [50] Dai MS, Lu H. *Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5*. J Biol Chem 2004; 279: 44475-44482
- [51] Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H. *Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition*. Mol Cell Biol 2004; 24: 7654-7668
- [52] Jin Aiwen, Itahana K, O'Keefe K, Zhang Y. *Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23*. Mol Cell Biol 2004; 24: 7669-7680
- [53] Chen D, Zhang Z, Li M, Wang W, Li Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zang R. *Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction:*

- binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function.* Oncogene 2007; 26: 5029-5037
- [54] Sun XX, Dai MS, Lu H. *5-Fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction.* J Biol Chem 2007; 282: 8052-8059
- [55] Sun XX, Dai MS, Lu H. *Mycophenolic acid activation of p53 requires ribosomal protein L5 and L11.* J Biol Chem 2008; 283: 12387-12392
- [56] Huang M, Ji Y, Itahana K, Zhang Y, Mitchell B. *Guanine nucleotide depletion inhibits pre-ribosomal RNA synthesis and causes nucleolar disruption.* Leuk Res 2008; 32: 131-141
- [57] Ghoshal K, Jacob ST. *Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-Fluorouracil.* Cancer Res 1994; 54: 632-636
- [58] Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF, Sherr CJ. *Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing.* Molecular Cell 2003; 11: 415-424
- [59] Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, Laiho M. *Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation.* Cancer Cell 2004; 5: 465-475
- [60] Krüger T, Zentgraf H, Scheer U. *Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins.* J Cell Biol 2007; 177: 573-578
- [61] Boisvert FM, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. *Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA.* J Cell Biol 2000; 18: 283-292
- [62] Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP. *PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus.* Nat Cell Biol 2004; 6: 665-672
- [63] Bhat KP, Itahana K, Jin A, Zhang Y. *Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation.* EMBO J 2004; 23: 2402-2412

- [64] Kristensen AR, Schandorff S, Høyer-Hansen M, Overbeck MN, Jäättelä M, Dengjel J, Andersen JS. *Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy*. Mol Cell Proteomics; 7: 2419-2428
- [65] Mahajan PB. *Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin*. Int J Immunopharmacol 1994; 16: 711-71
- [66] Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. *mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability*. Genes Dev 2004; 18: 423-434
- [67] Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. *Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11477-11481.
- [68] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon CJ. *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science 2004; 305: 1437-1441
- [69] Morgenstern JP, Land H. *Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line*. Nucleic Acid Res 1990; 18: 3587-3596
- [70] Shaulian E, Haviv I, Shaul Y, Oren M. *Transcriptional repression by the C-terminal domain of p53*. Oncogene 1995; 10: 671-680
- [71] Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Zhiyan W. *The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes Dev 1996; 10: 2949-2959
- [72] Hateboer G, Kerkhoven RM, Shvarts A, Bernards R, Beijersbergen RL. *Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins*. Genes Dev 1996; 10: 2960-2970
- [73] Markey MP, Angus SP, Strobeck MW, Williams SL, Gunawardena RW, Aro-now BJ, Knudsen ES. *Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional re-*



- pression identifies novel targets and distinctions from E2F action.* Cancer Res 2002; 62: 6587-6597
- [74] Young AP, Nagarajan R, Longmore GD. *Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway.* Oncogene 2003; 22: 7209-7217
- [75] Kalita K, Makonchuk D, Gomes C, Zheng JJ, Hetman M. *Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis.* J Neurochem, Epub Mar 2008.
- [76] Yuan X, Zhou Y, Casanova E, Chai M, Kiss E, Gröne HJ, Schütz G, Grummt I. *Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis.* Mol Cell 2005; 19:77-87
- [77] Harbour JW, Dean DC. *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms.* Genes Dev 2000; 14: 2939-1409
- [78] Frolov MV, Dyson NJ. *Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression.* J Cell Science 2004; 117: 2173-2181
- [79] Grewal SS, Evans JR, Edgar BA. *Drosophila TIF-IA is required for ribosome synthesis and cell growth and is regulated by the TOR pathway.* J Cell Biol 2007; 176: 1105-1113
- [80] Pession A, Farabegoli F, Treré D, Novello F, Montanaro L, Sperti S, Rambelli F, Derenzini M. *The Ag-NOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli.* Chromosoma 1991; 100: 242-250
- [81] Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, Yanagisawa J. *Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status.* Cell 2008; 133: 627-639
- [82] Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative rPCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods 2001; 25: 402-408

- [83] Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH. *p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization*. Nat Cell Biol 2000; 2: 148-155
- dousset Dousset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D, Huang S. *Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription*. Mol Biol Cell 2000; 11: 2705-2717
- [84] Neuman E, Flemington EK, Sellers WR, Kaelin WG. *Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter*. Mol Cell Biol 1994; 14: 6607-6615
- [85] Vorhoeve PM, Agami R. *The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus*. Cancer Cell 2003; 4: 311-319